

マイクロチップを用いた 生体高分子の分離分析法の確立

2014

左少 理恵

目次

第1章 序論	1
1-1 マイクロ化学分析システム(μ -TAS)	1
1-2 臨床現場即時検査(POCT)	3
1-3 研究の目的	5
1-4 参考文献	6
 第2章 マイクロチップ電気泳動装置を用いた 制限酵素断片長多形マルチ解析法の確立	 9
2-1 緒言	9
2-2 結果	14
2-2-1 12 チャンネル型マイクロチップを用いた マイクロチップ電気泳動法の再現性	14
2-2-2 12 チャンネル型マイクロチップにおける DNA 解析の有用性	16
2-2-3 12 チャンネル型マイクロチップを用いた ABO 式血液型の RFLP 解析	19
2-3 考察	25
2-4 実験	27
2-4-1 試薬・装置	27
2-4-2 マイクロチップ電気泳動	27
2-4-3 ヒト毛髪からのゲノム DNA の抽出	28
2-4-4 RFLP 解析に用いる DNA 断片の増幅	28
2-4-5 アガロースゲル電気泳動法(従来法)による RFLP 解析	29
2-4-6 マイクロチップ電気泳動法による RFLP 解析	30
2-5 参考文献	31

第3章 マイクロチップを用いた

血中バイオマーカー測定法の確立.....33

3-1 緒言.....	33
3-2 結果.....	36
3-2-1 マイクロチャネル内での抗原抗体反応による PICP の検出およびその再現性.....	36
3-2-2 マイクロチップ法の定量性.....	38
3-2-3 マイクロチップ法によるヒト血清中 PICP の測定.....	39
3-3 考察.....	42
3-4 実験.....	44
3-4-1 試薬・装置.....	44
3-4-2 パルスインジェクターを用いた マイクロチャネル底面への一次抗体の吐出・固定化.....	44
3-4-3 マイクロチャネル内の抗原抗体反応を利用した PICP の検出.....	45
3-4-4 ヒト全血からの血清分離.....	45
3-4-5 ELISA キットを用いた従来法での PICP の検出.....	45
3-5 参考文献.....	47

第4章 総括.....49

参考文献.....	52
-----------	----

本稿で用いた省略形

BR; buffer reservoir

BW; buffer waste reservoir

EBM; evidence based medicine

ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay

HRP; horseradish peroxidase

PCR; polymerase chain reaction

RFLP; restriction fragment length polymorphism

PBS; phosphate buffered saline

PICP; carboxyterminal propeptide of type I procollagen or procollagen type I C-peptide

POCT; point of care testing

QOL; quality of life

SNP; single nucleotide polymorphism

SR; sample reservoir

SW; sample waste reservoir

TE; tris-EDTA(ethylene diamine-tetraacetic acid)

TMBZ; 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine

μ-TAS; micro-total analysis systems

第 1 章 序論

1-1 マイクロ化学分析システム(μ -TAS)

マイクロ化学分析システム(Micro-Total Analysis Systems; μ -TAS)は半導体集積回路の製造に用いられる微細加工技術を応用し、従来試験管などを用いて行われてきた化学反応や生化学分析を、ガラスやプラスチック基板上に作成された微小な流路や空間で行う超小型の分析システムである。この μ -TAS という概念は、1990 年に Manz らによって提唱された[1]。 μ -TAS を構成する主要素は、マイクロポンプ[2-4]、バルブ[4-6]、ミキサー[7-9]、リアクター[10-12]、流路[11-13] などがあり、マイクロ流体デバイスと総称されている。マイクロ流体デバイスの特長は、当然ながらそのサイズであり、微小な空間つまりマイクロ空間において操作をおこなうことで、その比表面積(体積あたりの表面積の割合)の大きさや分子の拡散距離の減少による効果で反応を迅速化できたり[13]、マイクロ空間を並列化することでその操作を高効率化できることがあげられる。もちろん、反応場の縮小に伴って省サンプル・省試薬化も可能であり、さらにはその装置を小型化し自動化することでどこでも簡易に分析が可能であるシステムの構築が可能になる。つまり、これらマイクロ流体デバイスを集積化し μ -TAS を実現することができれば、迅速、省試料、高感度、易操作性といった多くの利点もたらされる[14]。

なお、マイクロ流体デバイスの素材としては、単結晶シリコン、ガラス、プラスチックがあげられる[14, 15]。単結晶シリコンは、多様な微細加工法を駆使して最も精度の高い微細加工が可能である点が優れるが、加工設備が高額であるためにコストが高いこと、紫外光・可視光領域において不透明であることから分析に光学的手法が使えないといったデメリットがある。ガラスは、化学的、熱的に安定な材料であるために表面処理なく多様な化学反応を行える点、光の透過性に優れているので分析に光学的手法が使える点で優れた材料であるが、その加工は精密性には欠けているため、精度の高い微細加工に向かない点がデメリットとしてあげられる。プラスチックは、実験室レベルの研究開発に要求される短時間での試作には非常に有利な材料であり、また、加工方法として低コストで大量生産に向く射出成型法もある材料である。さらに、多様な表面加

工技術によって表面を高機能化できる点や廃棄にコストがかからずディスプレイで使いやすい点についても有利な材料でもある。しかし、プラスチックは化学的、熱的安定性や光学的な特性ではガラスには及ばない点がデメリットとしてあげられる。このようにそれぞれ一長一短がある材料を、目的に応じて選択・微細加工しマイクロ流体デバイスの開発を行っていくことも μ -TAS の実現には不可欠である。

μ -TAS は従来、化学分析や化学工学の分野において盛んに研究されてきたが、近年ライフサイエンスや医療・福祉の現場への応用が期待されており、DNA の高速分離や高速シーケンス[11, 12, 14]、抗原抗体反応[16-19]、セルソータ[20-22]などの研究が盛んに行われてきた。中でもキャピラリー電気泳動法に基づく DNA シーケンサー[23, 24]により、ヒトゲノム計画がスタートした 1990 年頃にはヒトゲノムの全解読に 100 年かかると思われていたところ、わずか 13 年で解読が終了したことは記憶に新しい。この際明らかにされたヒトの全遺伝情報を利用してさらなる研究を行うポスト・ゲノムシーケンス時代に突入した現在では、研究の対象は、DNA はもちろんのこと、RNA、タンパク質、糖鎖などの生体内代謝物、さらには細胞にまで大きく広がってきている。現在ではこれら各種研究対象に対して μ -TAS を実現すべく多くの研究が日夜行われている。

1-2 臨床現場即時検査(POCT)

現代医療においては根拠に基づいた(evidence based medicine; EBM)、生活の質(quality of life; QOL)の向上を目指した治療が望まれている。そのため、各種疾患や病態の把握、治療効果の確認や予後の判定を行うための臨床検査が不可欠である。近年、これらの臨床検査について臨床現場即時検査(point of care testing: POCT)という考え方[25]にも注目が集まっている。POCT の概念や呼称はイギリスやアメリカに端を発しており、測定機器の発展に伴い 1990 年代後半から急速に普及してきた[26]。わが国でも POCT への関心は強かったが、POCT が急速に普及していった諸外国との医療環境における相違から、POCT とは何かといった議論から始まり、2004 年にようやく日本臨床検査自動化学会より POCT ガイドライン[27]が発行され、定義づけが行われた。その定義は「POCT とは、被検者の傍らで医療従事者が行う検査であり、検査時間の短縮および被検者が検査を身近に感ずるという利点を活かし、迅速かつ適切な診療・看護・疾患の予防、健康増進等に寄与し、ひいては医療の質を、被験者の QOL に資する検査である」というものであり、さらに補足の部分に「POCT は、小型で容易に持ち運べる機器・試薬をいうのではなく、あくまでも上記の役割を果たす、いわゆるシステム(仕組み)である」と記載されている。このように迅速性、小型化が要求される POCT デバイスはまさに医療の分野において μ -TAS の概念を踏襲しているものといえる。

POCT は従来の臨床検査よりも迅速な結果を必要とする際に用いられる[28-31]が、現状の臨床検査では検査当日に結果が得られることはまだまだ少ない。これは、各測定項目の測定に時間を要することもあるが、測定に高価な試薬や大型の分析装置が必要であったり、人件費の問題など経営的な問題もあり、外部の臨床検査会社に検査を外注していることがあげられる。これは μ -TAS を利用した POCT デバイスにより、測定の迅速化、装置の小型化・簡易化、そしてさらに省試薬による低コスト化が可能となれば、解決するものと期待される。

また、インフルエンザなどの感染症や心筋梗塞といった緊急性を要する疾患[29,30]や血糖値[31]などの一部の項目については POCT が実現されつつあるが、多くはイムノクロマト法に基づくために多項目は同時に測定できないこと、定性的検査であること、誤判定が起こりうること、といった問題があげられる。遺伝子検査などの POCT が実現していない項目についての POCT デバイスの開

発はもちろんのこと、これらの問題を解決しうる POCT デバイスの開発も望まれているのが現状である。

1-3 研究の目的

すべての化学的・生物学的操作を数 cm 角の基板上に集積した μ -TAS の実現に向け、多岐にわたる分野で研究開発が行われている。また、医療の分野における μ -TAS である POCT は実現しつつあるものの、測定項目が限られていること、同時に複数の解析はできないこと、定性はできても定量がかなわないといった問題点がある。そこで本研究では、 μ -TAS を構成するマイクロ流体デバイスの一つである、微細な流路であるマイクロチャネルを基板上に形成したマイクロチップを利用し、生体高分子である DNA とタンパク質における新規の分離分析法の確立を試みた。この際のマイクロチップの素材は、POCT へ応用も鑑みて、使い捨てが容易であり、大量生産に向けたプラスチックを選択した。

はじめにマイクロチャネルを利用したマイクロチップ電気泳動は、迅速かつ省サンプルに泳動分析が可能であり、既にその装置が市販されているが、主に核酸の鎖長・濃度分析に用いられるなど、適用範囲がきわめて限られている。過去に私が所属した研究室において、その適応拡大をめざした研究[32-38]を行い、マイクロチップ電気泳動装置の生化学的解析への応用性の高さを示している。そこで、マイクロチップ電気泳動装置のさらなる適応拡大をめざし、マイクロチャネルが並列化され複数試料を同時に解析できるマイクロチップを用いることで、遺伝子多型の判定に用いられる制限酵素断片長多形解析を迅速、省サンプル、高効率にマイクロチップ電気泳動装置にて行う方法を検討した(第 2 章)。

また近年、マイクロ流体デバイスを利用して、極少量の血液・体液を用いて各種病態・治療効果などの判定を行うバイオチップの研究開発[39-41]が盛んに行われている。特に血液中においては、多くの生体機能や病気の状態を示すタンパク質が含まれており、臨床でも血中バイオマーカーとして測定が行われている。これらバイオマーカーの測定には抗原抗体反応を利用した Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) が頻用されている。そこで、マイクロチャネルの底面に極少量の液体の操作が可能であるインクジェット技術を用いることで一次抗体を吐出・固定化したマイクロチップを用い、ELISA の原理を利用した迅速、省サンプルな血中バイオマーカー検出系の確立を試みた(第 3 章)。

1-4 参考文献

- [1] A. Manz, H.M. Widmer, *Sensors Actuators B*, **1**, 244-248(1990)
- [2] Y.N. Wang, C.H. Tsai, L.M. Fu, L.K. Lin Liou, *Biomicrofluidics*, **7**, 44118(2013)
- [3] P.S. Chee, R. Arsat, T. Adam, U. Hashim, R.A. Rahim, P.L. Leow, *Sensors (Basel)*, **12**, 12572-12587 (2012)
- [4] L. Jingmin, L. Chong, X. Zheng, Z. Kaiping, K. Xue, W. Liding, *PLoS One*, **7**, e50320(2012)
- [5] J. Quist, S.J. Trietsch, P. Vulto, T. Hankemeier, *Lab Chip*, **13**, 4810-4815(2013)
- [6] E.C. Jensen, A.M. Stockton, T.N. Chiesl, J. Kim, A. Bera, R.A. Mathies, *Lab Chip*, **13**, 288-296(2013)
- [7] Y. Li, F. Xu, C. Liu, Y. Xu, X. Feng, B.F. Liu, *Analyst.*, **138**, 4475-4482(2013)
- [8] T. Matsunaga, H.J. Lee, K. Nishino, *Lab Chip*, **13**, 1515-1521(2013)
- [9] Y. Li, D. Zhang, X. Feng, Y. Xu, B.F. Liu, *Talanta*, **88**:175-180(2012)
- [10] X. Ma, W.Y. Tseng, M. Eddings, P.Y. Keng, R.M. van Dam, *Lab Chip*, **14**, 280-285(2014)
- [11] L. Zhang, F. Dang, Y. Baba, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30**, 1645–1654 (2003)
- [12] N. Kaji, Y. Tezuka, Y. Takamura, M. Ueda, T. Nishimoto, H. Nakanishi, Y. Horiike, Y. Baba, *Anal. Chem.*, **76**, 15-22 (2004)
- [13] K. Sato, A. Hibara, M. Tokeshi, H. Hisamoto, T. Kitamori, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **55**, 379-391 (2003)
- [14] K. Huikko, R. Kostianen, T. Kotiaho, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **20**, 149-171 (2003)
- [15] 馬場嘉信, ナノテクノロジー時代のバイオ分離・計測技術, CMC 出版 (2011)
- [16] K. Sato, K. Mawatari, T. Kitamori, *Lab Chip*, **8**, 1992–1998 (2009)
- [17] T. Yasukawa, M. Suzuki, T. Sekiya, H. Shiku, T. Matsue, *Biosens Bioelectron*, **22**, 2730–2736 (2007)
- [18] K. Sato, M. Yamanaka, T. Hagino, M. Tokeshi, H. Kimura, *et al.*, *Lab Chip*, **4**, 570–575 (2004)
- [19] K. Sato, M. Yamanaka, H. Takahashi, M. Tokeshi, Kimura H, *et al.*, *Electrophoresis*, **23**, 734–739 (2002)

- [20] Y. Shirasaki, J. Tanaka, H. Makazu, K. Tashiro, S. Shoji, S. Tsukita, T. Funatsu, *Anal. Chem.*, **78**, 695-701 (2006)
- [21] C.C. Lin, A. Chen, C.H. Lin, *Biomed. Microdevices*, **10**, 55-63 (2008)
- [22] J. Sun, Y. Gao, R.J. Isaacs, K.C. Boelte, P.C. Lin, E.M. Boczko, D. Li, *Anal. Chem.*, **84**, 2017-2024 (2012)
- [23] S. Behr, M. Mätzig, A. Levin, H. Eickhoff, C. Heller, *Electrophoresis*, **20**, 1492-1507(1999)
- [24] K. Shibata, M. Itoh, K. Aizawa, S. Nagaoka, N. Sasaki, *et al.*, *Genome Res.*, **10**, 1757-1771 (2000)
- [25] P. St-Louis, *Clin. Biochem.*, **33**, 427–440 (2000)
- [26] M. Hughes, *Point of Care*, **1**, 84-94 (2002)
- [27] 日本臨床検査自動化学会編 POCT ガイドライン, *臨床検査自動化学会会誌*, **29** (2004).
- [28] C. Briggs, D. Guthrie, K. Hyde, I. Mackie, N. Parker, *et al.*, *Br. J. Haematol.*, **142**, 904–915 (2008)
- [29] F. Di Serio, R. Lovero, M. Leone, R. De Sario, V. Ruggieri, *et al.*, *Clin. Chem. Lab Med.*, **44**, 768–773 (2006).
- [30] P. von Lode, *Clin. Biochem.*, **38**, 591–606 (2005)
- [31] M. Wehmeier, B.T. Arndt, G. Schumann, W.R. Kulpmann, *Clin. Chem. Lab Med.*, **44**, 888–893 (2006)
- [32] M. Kataoka, Y. Fukura, Y. Shinohara, Y. Baba, *Electrophoresis*, **26**, 3025-3031 (2005)
- [33] E. Maeda, M. Kataoka, M. Hino, K. Kajimoto, N. Kaji, M. Tokeshi, J. Kido, Y. Shinohara, Y. Baba, *Electrophoresis*, **28**, 2927-2933 (2007)
- [34] E. Maeda, M. Kataoka, S. Yatsushiro, K. Kajimoto, M. Hino, N. Kaji, M. Tokeshi, M. Bando, J. Kido, M. Ishikawa, Y. Shinohara, Y. Baba, *Electrophoresis*, **29**, 1902-1909 (2008)
- [35] Y. Umemoto, M. Kataoka, S. Yatsushiro, M. Watanabe, J. Kido, R. Kakuhata, T. Yamamoto, Y. Shinohara, Y. Baba, *Anal. Biochem.*, **388**, 161-163 (2009)
- [36] Y. Umemoto, M. Kataoka, S. Yatsushiro, S. Yamamura, T. Ooie, J. Kido, T. Yamamoto, Y. Shinohara, Y. Baba, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **52**, 323-328 (2010)

- [37] Y. Yamaguchi, S. Yatsushiro, S. Yamamura, H. Abe, K. Abe, M. Watanabe, K. Kajimoto, Y. Shinohara, Y. Baba, M. Kataoka, *Analyst*, **136**, 2247-2251(2011)
- [38] M. Kataoka, S. Inoue, K. Kajimoto, Y. Shinohara, Y. Baba, *Eur. J. Biochem.*, **271**, 2241–2247(2004)
- [39] Y. Yamaguchi, T. Moriki, A. Igari, Y. Matsubara, T. Ohnishi, K. Hosokawa, M. Murata, *Thromb. Res.*, 132, 263-270 (2013)
- [40] M. Avila, A. Floris, S. Staal, A. Ríos, J. Eijkel, A. van den Berg A, *Electrophoresis*, *in press* (2013)
- [41] E. Lim, A. Tay, J. Von Der Thusen, M.B. Freidin, V. Anikin, A.G. Nicholson, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, *in press* (2013)

第2章 マイクロチップ電気泳動装置を用いた 制限酵素断片長多形マルチ解析法の確立

2-1 緒言

2003年にヒトゲノム計画が完遂し、約30億塩基対にも及ぶヒトゲノムの全遺伝子配列が公表された[1-3]。ポスト・ゲノムシーケンス時代に突入した現在では各種疾患の遺伝的背景、個人による薬剤の有効性の違いなどといった研究が盛んに行われており、このようなヒト個人による差異は一塩基多形(single nucleotide polymorphism: SNP)に由来するものがあることが多く報告されている[4-6]。ヒトの遺伝子配列を個人で比較すると、約300万個程度の置換・欠失などによる一塩基の多様性があるといわれている。これらの多様性の中でSNPはある特定の集団において1%以上の高頻度でみられる一塩基の変異であり、その確認方法の一つとして古くから制限酵素断片長多形(restriction fragment length polymorphism: RFLP)解析が行われてきた[7]。RFLP解析はSNPの有無で遺伝子配列中に制限酵素認識部位が出現したり消失したりする場合に利用できる手法である。この手法は次の流れにより行う。まず、SNPの存在する領域を含めてポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction: PCR)でゲノムDNAを鋳型として増幅したDNA断片を得る。続いて、このDNA断片を制限酵素処理する。次いで、制限酵素処理前後のDNA断片についてアガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイド染色などで電気泳動分析する。最後に、この電気泳動の結果得られたDNA断片の鎖長の違いを移動度から確認する。なおこの際、正確なDNA鎖長を算出するには、同時に電気泳動を行ったDNAサイズマーカーの移動度を横軸に、DNA鎖長の対数値を縦軸にグラフを作成し、得られた直線により目的のDNA断片の移動度から算出することが可能である[8]。これら一連の操作により制限酵素認識部位の存在の有無、つまりSNPの存在を判定できるが、PCR後の制限酵素処理および泳動分析にそれぞれ1時間ずつの計2時間と時間を要し操作も煩雑であること、試料であるDNA断片についても μg 単位で必要

であるといった欠点がある。

RFLP 解析にて解析可能な SNP による個人差でよく知られているものに ABO 式血液型があり、医学や法医学などの分野で利用されている[9-14]。ABO 式血液型については、その表現型が赤血球の表面に存在する糖鎖に由来すること、またその糖鎖が合成される際の転移酵素の構造遺伝子配列は古くから報告されている[15-17]。ABO 式血液型の表現型は、A、B、O、AB 型が存在するが、これは A 抗原、B 抗原、H 抗原と呼ばれる各糖鎖の赤血球表面の存在様式により決定される。A 抗原および B 抗原は、それぞれ A 転移酵素および B 転移酵素により合成されるが、H 抗原は塩基欠失型の SNP により遺伝子のフレームシフトが起これば完全な転移酵素が作られないために A 抗原および B 抗原の前駆物質の状態で赤血球表面に存在している。A 転移酵素の遺伝子である A 対立遺伝子の遺伝子配列を基準とした場合、B 転移酵素の遺伝子である B 対立遺伝子には 7 つの塩基置換型の SNP(297、526、657、703、796、803、930 番目の塩基)があることが知られている。また H 抗原の存在に関与する、完全な転移酵素を作れない遺伝子である O 対立遺伝子では A 対立遺伝子の配列を基準としたとき 261 番目の塩基が欠失していることが知られている。図 2-1A に示したように、これら SNP のうち 261 番目と 526 番目の塩基に存在する 2 つの SNP により制限酵素認識部位の有無が生じる。このことを利用して①A 対立遺伝子および B 対立遺伝子と O 対立遺伝子の鑑別に 261 番目の SNP により制限酵素 *Kpn* I の認識部位が O 対立遺伝子に出現すること[15,17]、②A 型遺伝子および O 型遺伝子と B 型遺伝子の鑑別に 526 番目の SNP により制限酵素 *Ban* I の認識部位が B 型遺伝子に出現すること[9]、この①と②を利用した 2 つの RFLP 解析結果を組み合わせることで、ABO 式血液型に 6 種類存在する遺伝子型(A 型には AA と AO、B 型には BB と BO、O 型には OO、AB 型には AB)の判定が可能である(表 2-1)。なお、図 2-1 で示しているが 285 bp の断片には ABO 型遺伝子全てに *Ban* I の認識部位が初めから 1 つ存在していることに注意が必要である。

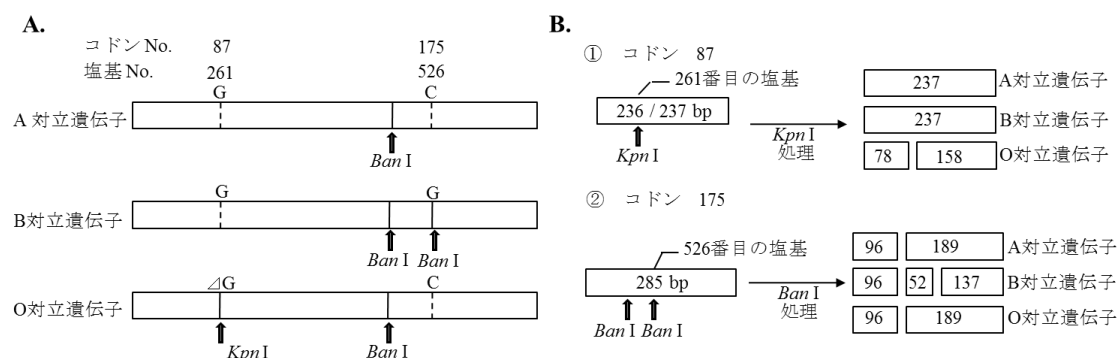


図 2-1 ABO 式血液型の RFLP 解析

(A)各対立遺伝子における SNP による制限酵素認識部位の有無を示した。実線は制限酵素認識部位を、破線は SNP により消失する制限酵素認識部位を示す。またΔG は G の欠失を表す。

(B)本研究で用いた RFLP 解析の実験系で利用した O 対立遺伝子の Kpn I による A 対立遺伝子および B 対立遺伝子との鑑別(①)と、B 対立遺伝子の Ban I による A 対立遺伝子および O 対立遺伝子との鑑別(②)における DNA 断片の鎖長を示す。

表 2-1 SNP により存在の有無が変わる制限酵素認識部位での切断パターンによる ABO 式血液型の遺伝子型決定

表中の+は該当する制限酵素により切断されることを、-は切断されないことを示す。つまり、-/-はどちらの対立遺伝子由来の DNA 断片も切断されない(まったく切断されない)ことを、+/-は片方の対立遺伝子由来の DNA 断片が切断されるがもう片方の対立遺伝子由来の DNA 断片は切断されずに残ることを、+/+はどちらの対立遺伝子由来の DNA 断片も切断される(完全に切断される)ことを示す。

表現型	遺伝子型	Kpn I	Ban I
A	AA	-/-	-/-
	AO	+/-	-/-
B	BB	-/-	+/+
	BO	+/-	+/-
O	OO	+/+	-/-
AB	AB	-/-	+/-

現在、迅速・省試料・簡便に核酸等の分離を行うマイクロチップ電気泳動装置がすでに市販されている。マイクロチップ電気泳動は、プラスチックやガラス製のマイクロチップ基板上に形成した μm 単位の微小な流路であるマイクロチャンネルを利用して電気泳動を行うことで、省試料、迅速、高感度に核酸等の分離解析が可能となる[18]。マイクロチップ電気泳動の原理を図 2-2A から C に示す。マイクロチップ電気泳動で用いられるチップは、図 2-2A のように基本的に 2 つのマイクロチャンネルがチップ上で交差する形状をもつ。試料の導入量が pl オーダーとごく微量であるマイクロチップ電気泳動においては、再現性の良い試料導入法が必要とされる。この条件を満たす形状として考案されたものがこの交差型マイクロチャンネルである。

しかし、迅速・省サンプル・簡便でありながらもマイクロチップ電気泳動装置は主に DNA 鎖長解析・濃度測定や RNA の性状確認に用いられるのみである。そこで、私の所属した研究室では市販のマイクロチップ電気泳動装置を様々な生物学的解析へ応用することを検討し[19-25]、既にマイクロチップ上の試料ウェル内にてオンチップで制限酵素処理を行い経時的に電気泳動分析を行うことができることを報告している[25]。この結果を踏まえ、本研究では市販のマイクロチップ電気泳動装置のひとつである日立 SV1210 形 (以下 SV1210) および 12 チャンネル型マイクロチップ(図 2-2D)を用いることで一枚のマイクロチップにて迅速、省試料に複数人を同時解析できる RFLP マルチ解析を行う実験系の確立を試みた。

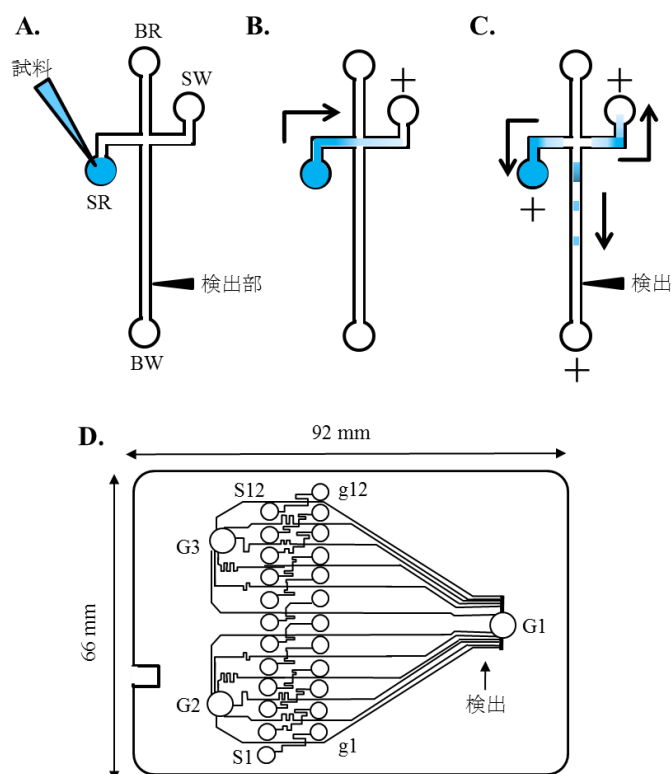


図 2-2 マイクロチップ電気泳動の原理と 12 チャンネル型マイクロチップ

(A)試料導入および分離に利用される 2 つのマイクロチャンネルが交差した形状を持ち、それぞれの末端にウェルが形成されている。4 つのウェルはそれぞれ、試料導入 (Sample reservoir; SR)、試料廃液 (Sample waste reservoir; SW)、分離用緩衝液の導入 (Buffer reservoir; BR)、分離後の廃液 (Buffer waste reservoir; BW) に用いる。このマイクロチャンネル内に分離用の泳動ゲルをみだし、SR に試料を添付する。

(B)SR と SW に電圧をかけると、分離用のマイクロチャンネルとの交点をへて、SR から SW にむかって試料が泳動する。このとき、導入用のマイクロチャンネル内でも成分の分離はおこるが、継続的に SR より試料が導入されるので、一定時間を経ると平衡化され交点の部分の試料が元の試料と同じ成分構成となる。なお、この電気泳動は導入泳動と呼ばれる。

(C)交点の部分が元の試料と同じ成分構成になったのち、電圧を切り替え BR と BW に電圧をかけると交点に存在する一定量の試料が分離用マイクロチャンネルに導入され、成分の分離が行われる。この電気泳動は分離泳動と呼ばれる。この際、分離用マイクロチャンネルへの過剰な試料の導入を防ぐため、SR および SW についても電圧をかける。検出は目的とする試料により、蛍光検出法、UV 可視吸収検出法、熱レンズ検出法などがあげられるが、生体高分子の検出には一般的に感度・選択性に優れる蛍光検出法が用いられる。

(D)今回の実験に使用した 12 チャンネル型マイクロチップ (*i*-チップ 12)。このマイクロチップにおいては S1-12 が SR、g1-12 が SW、G1 が BW、G2-3 が BR である。

2-2 結果

2-2-1 12チャンネル型マイクロチップ用いたマイクロチップ電気泳動法の再現性

12チャンネル型マイクロチップはポリメチルメタクリレート製で、12本の並列化されたマイクロチャンネルを用いて一度に12試料を同時に電気泳動分析できるチップである(図2-2D)。このマイクロチップでは、図2-1Aに示したSRおよびSWのウェル(それぞれ図2-2D中のS1-12およびg1-12)はマイクロチャンネルごとに独立しているが、BRおよびBWのウェル(それぞれ図2-2D中のG2-3およびG1)が集約されることで、12試料を一度に同時に泳動分析することを可能としている。本研究ではABO式血液型のRFLP解析の実験系を考慮し10-500 bpのDNAの分離に適している*i*-SDNA12キットに添付している蛍光色素、泳動ゲルを用いることとした。

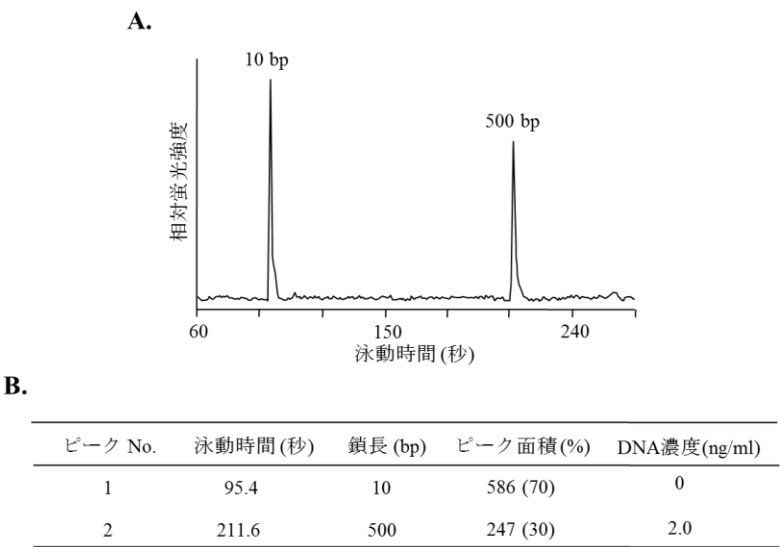


図2-3 SV1210によるマイクロチップ電気泳動後に得られる解析データ例

(A) *i*-SDNA12キットに添付の10 bpと500 bpのDNA断片を含んだ内部標準溶液とTE緩衝液を9:1で混合した溶液10 µlを試料として、12チャンネル型マイクロチップとSV1210を用いて電気泳動分析した際に得られるエレクトロフェログラムの1例を示した。このエレクトロフェログラムは電気泳動分析の終了と同時にSV1210ソフトウェアに表示される。

(B)エレクトロフェログラムと同時にSV1210ソフトウェアにより解析された各種データも自動で表示される。ピークNo.は泳動時間が早い順にナンバリングされる。

なお、SV1210 における電気泳動分析の結果は各チャンネルについて図 2-3A に示すようなエレクトロフェログラムの形で表示されるほか、ここでは示さないがゲルイメージの表示も可能である。また、エレクトロフェログラムと同時に図 2-3B に示したような解析結果が表示される。図 2-3 については、内部標準のみの電気泳動分析であるが、試料 DNA 断片を電気泳動した場合は、その鎖長および濃度も同時に表示される。2-1 に述べたが、従来はグラフを作成し行っていた鎖長計算を電気泳動と同時に終了できる。なお、この際表示される DNA の濃度は内部標準のうち 500 bp の DNA 断片のピーク面積をもとに計算される。10 bp の DNA 断片については、極短鎖の DNA ではピーク面積に再現性がないため、実際には 40 ng/μl が電気泳動分析に供されているが解析ソフトの仕様上その濃度は 0 ng/ml と表示される。

はじめに、*i*-SDNA12 キット添付の 10 bp および 500 bp の内部標準用 DNA 断片を用いて、5 枚の 12 チャンネル型マイクロチップ、つまり合計 60 チャンネル間でのマイクロチップ電気泳動による解析の再現性を検討した。すべてのチャンネルにおいて、電気泳動開始から 92–96 秒後に 10 bp、204–214 秒後に 500 bp の 2 本の明確なシグナルピークが検出された。この時の 10 bp および 500 bp の DNA 断片の泳動時間の相対標準偏差はそれぞれ 0.98% と 1.11% であり、60 の異なるチャンネル間での再現性は十分であった。

つづいて、2-1 で述べたようにマイクロチップ電気泳動法では、実際に電気泳動分析に供される試料の容量が数十 pl とごく微量である。したがって、一度の電気泳動分析を完了したマイクロチップの SR には解析試料の大部分が存在するため、同一のマイクロチップにより連続して繰返しの泳動分析が可能であると考えられる。このことを踏まえて、同一のチャンネルで複数回泳動分析を行った場合の繰返し性について検討を行った。1 度の泳動分析が終了したのちに、引き続いて泳動分析をスタートすることで 3 回の泳動分析を行った場合の 10 bp、500 bp の DNA 断片の泳動時間を表 2-2 に示す。この結果、同一のチャンネルで 3 回の泳動分析を行った場合でも、10 bp および 500 bp の DNA 断片の泳動時間の相対標準偏差は 2.2% および 1.5% であり、同一のチャンネルで複数回の電気泳動分析を行ってもその繰返し性は十分であるといえる。

表 2-2 同一チャネルで複数回泳動分析を行った場合の

10 bp および 500 bp の DNA 断片の泳動時間

i-SDNA12 キットに添付の内部標準溶液と TE 緩衝液 を 9:1 で混合した溶液 10 μ l を試料として同一の 12 チャネル型マイクロチップにて泳動分析完了後引き続いてのマイクロチップ電気泳動を 3 回行った時の 10 bp および 500 bp の DNA 断片の泳動時間を示す。

泳動分析回数	泳動時間 (秒)	
	10 bp	500 bp
1	96.0	214.0
2	97.6	217.2
3	100.2	220.4
平均	97.9	217.2
相対標準偏差(%)	2.2	1.5

2-2-2 12 チャネル型マイクロチップにおける DNA 解析の有用性

2-2-1 の実験より、12 チャネル型マイクロチップを用いたマイクロチップ電気泳動により内部標準 DNA を再現性よく泳動分析できることが示された。そこで次に、本装置を用いた場合の DNA 断片の鎖長解析の正確性および定量性について検討を行った。

はじめに、DNA 断片の鎖長解析の正確性について検討を行った。市販されている、50, 150, 300, 500, 766 bp の DNA 断片を含んだ PCR Marker に、別途市販の 10 bp の DNA 断片(NoLimit DNA Ladder 10 bp)を加えた溶液を試料として解析を行った。その結果、10–766 bp の DNA 断片に相当する 6 本のシグナルピークが明確に検出された(図 2-4)。図 2-4B に DNA 断片の鎖長と泳動時間の関係を示すが、50–300 bp において直線性がみられ、図 2-1B に示した今回の RFLP 解析で扱う 52–285 bp の DNA 断片の解析に申し分ない結果が得られた。また、長鎖 DNA 断片において泳動時間との関係に直線性が失われたことは、泳動ゲルの中に DNA 結合性の蛍光色素が含まれていることに起因すると思われる[26]。さらに、25-766 bp の DNA 断片を含む市販 DNA サイズマーカー Low molecular weight DNA Ladder を用いて同様の解析を行ったが、50–300 bp の領域で DNA 断片の鎖長と泳動時間の関係に直線性が見られることなどほぼ同等の結果が得られた(結果は示さない)。

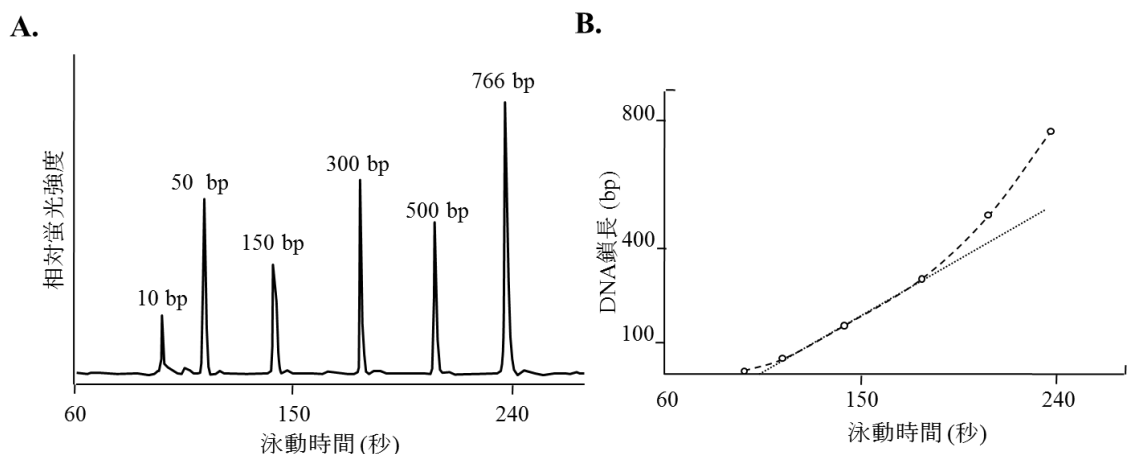


図 2-4 マイクロチップ電気泳動における DNA 断片の泳動時間とその鎖長の関係

(A)300 ng/ μ l PCR Marker 1 μ l、100 ng/ μ l 10 bp DNA 断片 1 μ l、TE 緩衝液 8 μ l を試料ウェルに加え、12 チャンネル型マイクロチップを用いて SV1210 にて泳動分析を行い、得られたエレクトロフェログラム。12 チャンネルすべてについて同様の実験を行ったが、1 チャンネルにおける典型的な結果を示した。

(B)A における泳動時間(秒)を横軸、DNA 鎖長(bp)を縦軸として作成したグラフを示す。破線(---)は、各点間をつないだ曲線である。点線(····)の直線により泳動時間と DNA 鎖長の関係に 50–300 bp の領域において直線性が得られていることがわかる。

つづいて、内部標準を利用した DNA 断片の鎖長解析の正確性及び定量性について検討を行った。本解析では、10 bp と 500 bp の DNA 断片を含む *i*-SDNA12 キット添付の内部標準溶液と混合した状態で最終濃度が 0, 0.2, 0.4, 1, 2, 4, 6 及び 8 ng/ μ l となるように調製した、2-2-3 の RFLP 解析に使用する 237 bp の DNA 断片を試料として用いた。これら各濃度の試料 10 μ l を 12 チャンネル型マイクロチップの 8 つのチャンネルを使用して SV1210 にて電気泳動分析を行った結果を図 2-5 に示す。この結果、図 2-5B に示すように 237 bp の DNA 断片の泳動時間は濃度に依存せずほぼ同一であったことから、泳動時間と DNA 鎖長の関係に直線性が得られることが分かっている 50–300 bp の領域では、試料 DNA 濃度に依存せず DNA の鎖長解析が可能であるといえる。この DNA 濃度に依存せず鎖長解析が可能であるという結果は過去の報告とも一致する[25]。また、実際の DNA 濃度と解析 DNA 濃度の関係を示した図 2-5C より、<2 ng/ μ l の領域で解析 DNA 濃度は正確な DNA 濃度を示していることがわかる。さらに、2-2-3 で RFLP 解

析に用いるもう一種の285 bpのDNA断片についても同様の解析を行ったところ同等の結果が得られた(結果は示さない)。これらの結果より、12チャンネル型マイクロチップを用いて電気泳動分析を行うことで、DNA断片の鎖長解析や濃度決定を行うことが可能であることが示された。

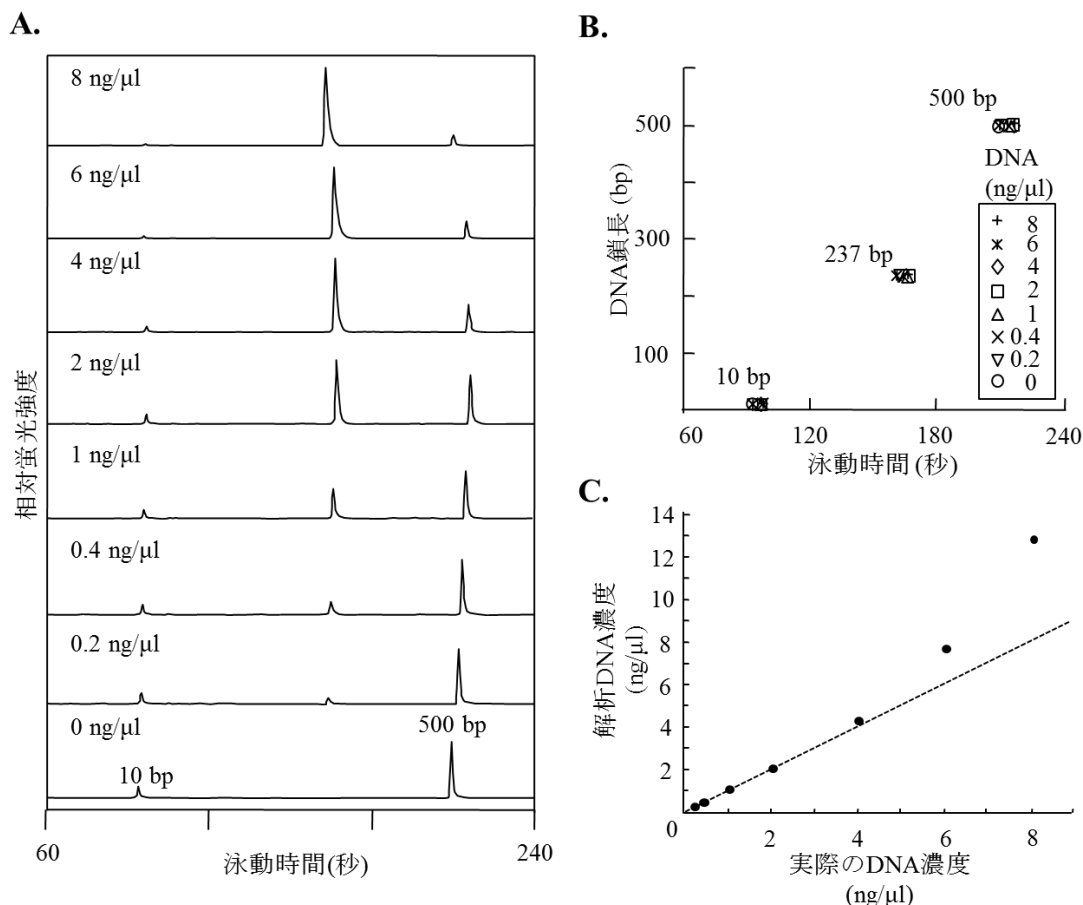


図 2-5 12 チャンネル型マイクロチップによる電気泳動分析における泳動時間および解析 DNA 濃度への影響

(A) 0、2、4、10、20、40、60 および 80 ng/μl の 237 bp DNA 断片 1 μl に内部標準溶液 9 μl を加えた解析試料を 12 チャンネル型マイクロチップの 8 つのチャンネルに添加し泳動分析を行った結果得られたエレクトロフェログラムを示す(試料の解析に使用しなかった 3 つのチャンネルの SR には TE 緩衝液を 10 μl 添付した)。なお SR 中の DNA 最終濃度はそれぞれ、0、0.2、0.4、1、2、4、6 および 8 ng/μl である。

(B) 泳動時間(秒)を横軸、DNA 鎖長(bp)を縦軸として A の結果から作成したグラフを示す。

(C) 実際の DNA 濃度を横軸、SV1210 による電気泳動分析で解析された DNA 濃度を縦軸として A の結果から作成したグラフを示す。

2-2-3 12 チャネル型マイクロチップを用いた ABO 式血液型の RFLP 解析

ここまでの検討により、12 チャネル型マイクロチップを用いたマイクロチップ電気泳動法により、再現性良く DNA の鎖長解析、定量を行うことが可能であることが示された。そこで、本装置を用いて ABO 式血液型の RFLP 解析を行うことが可能であるか検討をおこなった。

はじめに、今回の解析対象である ABO 式血液型について従来法であるアガロースゲル電気泳動法にて遺伝子型決定を行った。ABO 式血液型の表現型が判明しているヒトの毛髪の毛根鞘細胞から抽出したゲノム DNA を鋳型として PCR 法にて増幅した 236/237 bp および 285 bp の 2 種類の DNA 断片について、それぞれ 100 ng 分を 1.5 ml チューブ内で 37 °C、1 時間の制限酵素処理を行い、その後 4% アガロースゲルを用いて電気泳動分析後エチジウムブロマイド染色を行った。その結果を図 2-6 に示したが、いずれの試料においても制限酵素処理を行った結果を組み合わせることで表 2-1 に示したように遺伝子型の判定が可能であり、それは表現型とも矛盾していなかった。試料 No.1(A 型)においては、*Kpn* I 及び *Ban* I どちらの制限酵素処理によっても SNP に由来する制限酵素認識部位での DNA 断片の切断が見られないことから、その遺伝子型は AA と判定される。試料 No.2(A 型)においては、236/237 bp の DNA 断片について *Kpn* I によって切断される断片と切断されない断片があり、285 bp の DNA 断片について *Ban* I によって SNP に由来する制限酵素認識部位での切断が見られないことから、その遺伝子型は AO と判定される。試料 No.3(B 型)においては 236/237 bp の DNA 断片は *Kpn* I により切断されず、285 bp の DNA 断片についてすべて *Ban* I により SNP に由来する制限酵素認識部位で切断されることから、その遺伝子型は BB と判定される。試料 No.4(B 型)においては、236/237 bp の DNA 断片について *Kpn* I によって切断される断片と切断されない断片があり、285 bp の DNA 断片について *Ban* I によって SNP に由来する制限酵素認識部位で切断される断片と切断されない断片が存在することから、その遺伝子型は BO と判定される。試料 No.5(O 型)においては、236/237 bp の DNA 断片についてすべて *Kpn* I によって切断され、285 bp の DNA 断片について *Ban* I によって SNP に由来する制限酵素認識部位で切断される断片と切断されない断片が存在することから、その遺伝子型は OO と判定される。試料 No.6(AB 型)においては 236/237 bp の DNA 断片は *Kpn* I により切断されず、285 bp の DNA 断片について *Ban* I により SNP に由来

する制限酵素認識部位で切断される断片と切断されない断片が存在することから、その遺伝子型は AB と判定される。

つづいて、これら試料 No.1-6 を用い 12 チャンネル型マイクロチップを用いて、アガロースゲル電気泳動法を用いた従来法と同等の結果が得られるかどうか検討を行った。2-1 で述べたが Kataoka らにより、今回検討をおこなった SV1210 とは異なるが、ほぼ同じ仕組みのマイクロチップ電気泳動装置日立 SV1100 形においてマイクロチップの SR 中でオンチップにて DNA 制限酵素処理を行い、同一のチャンネルで複数回電気泳動分析を行うことで経時的な解析が可能であると報告されている[25]。この報告を踏まえ、RFLP 解析の制限酵素処理前後の電気泳動分析を同一のマイクロチップを利用して行うこととした。なお、2-2-2 の結果より SR 中の DNA 最終濃度が 2 ng/μl 未満の領域で DNA 断片の定量性が保持されていることから、使用する DNA 断片の量は SR 中の最終濃度が 2 ng/μl となるように 20 ng/チャンネルとした。各チャンネルに制限酵素を添付する前に一度電気泳動分析を行い、電気泳動分析終了後速やかに各 SR に制限酵素を添付し、25℃ に保たれた SV1210 内で 20 分間インキュベーション後再度電気泳動分析を行った結果得られたエレクトロフェログラムを図 2-7 に示す。この結果、すべての試料において、内部標準である 10 bp および 500 bp の DNA 断片のシグナルピークに加え、従来法のアガロースゲル電気泳動で確認できた DNA 断片に対応するシグナルピークが明確に検出された。表 2-3、2-4 に制限酵素処理前後の鎖長解析結果を示したが、いずれの DNA 断片についても図 2-1B に示した理論値から数 bp の誤差で結果を得ることができた。したがって、12 チャンネル型マイクロチップを用いたマイクロチップ電気泳動法による RFLP 解析により、従来のアガロースゲル電気泳動法と同等に ABO 式血液型の遺伝子型の判定が可能であるといえる。なお、マイクロチップ電気泳動法を用いて同様の RFLP 解析を 3 回行い各 DNA 断片における泳動時間の相対標準偏差を求めたが、0.88-1.89% の範囲であり再現性も得られた(データは示さない)。

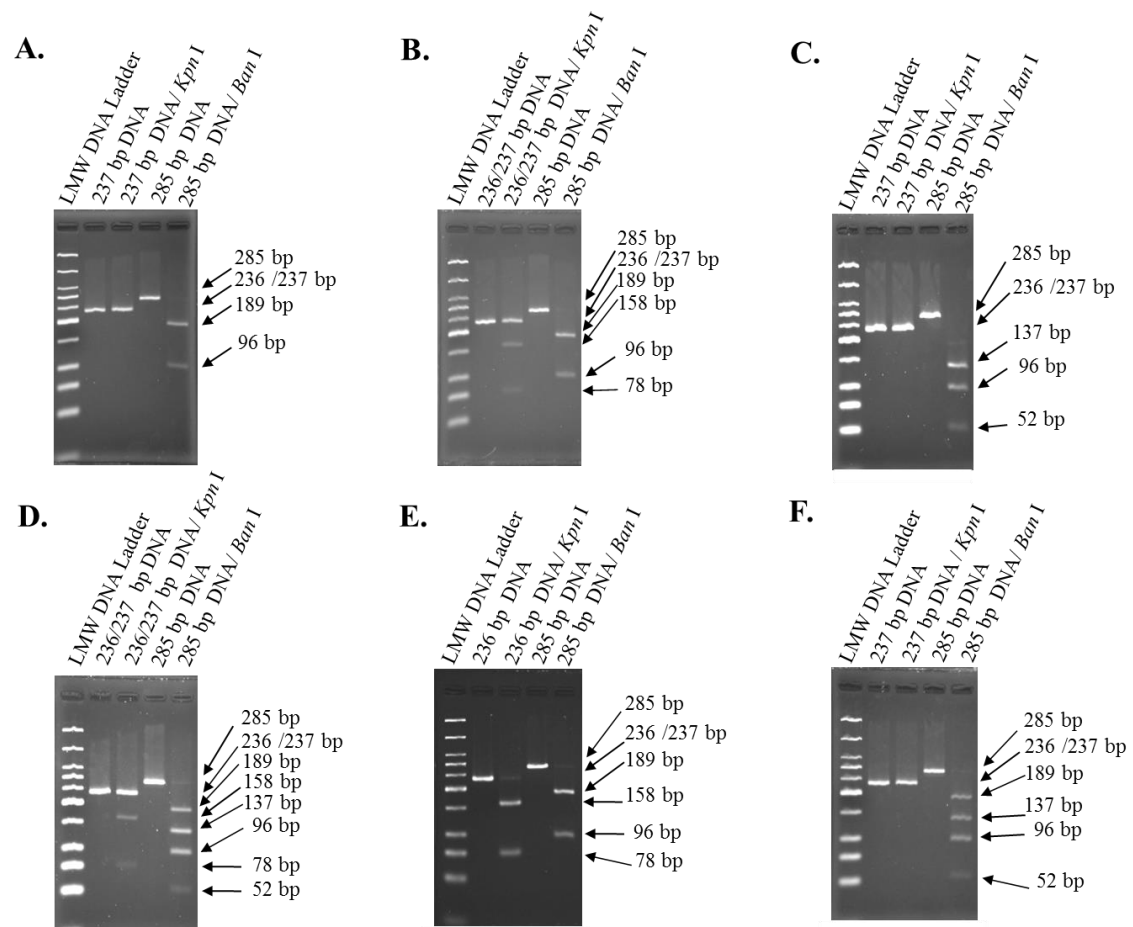


図 2-6 アガロースゲル電気泳動を用いた従来法による RFLP 解析

20 ng/μl に調製した 236/237 bp および 285 bp の DNA 断片 5 μl、70 mM MgCl₂ 2 μl、GIBCO DW 4 μl、*Kpn* I および *Ban* I 1 μl を 1.5 ml チューブに加え、37 °C で 1 時間インキュベートした。これら制限酵素処理後の DNA 断片を 4%アガロースゲル電気泳動 (100V、30 分) にて分離泳動したのち、エチジウムブロマイド染色を行った結果を示す。この際同時に Low molecular weight DNA Ladder を DNA サイズマーカー、20 ng/μl に調製した 236/237 bp および 285 bp の DNA 断片 5 μl、GIBCO DW 15 μl を混合した試料を制限酵素処理前の DNA 断片として電気泳動分析を行った。なお、A は試料 No.1、B は試料 No.2、C は試料 No.3、D は試料 No.4、E は試料 No.5、F は試料 No.6 の結果である。図中には各バンドの DNA 鎖長を合わせて記した。

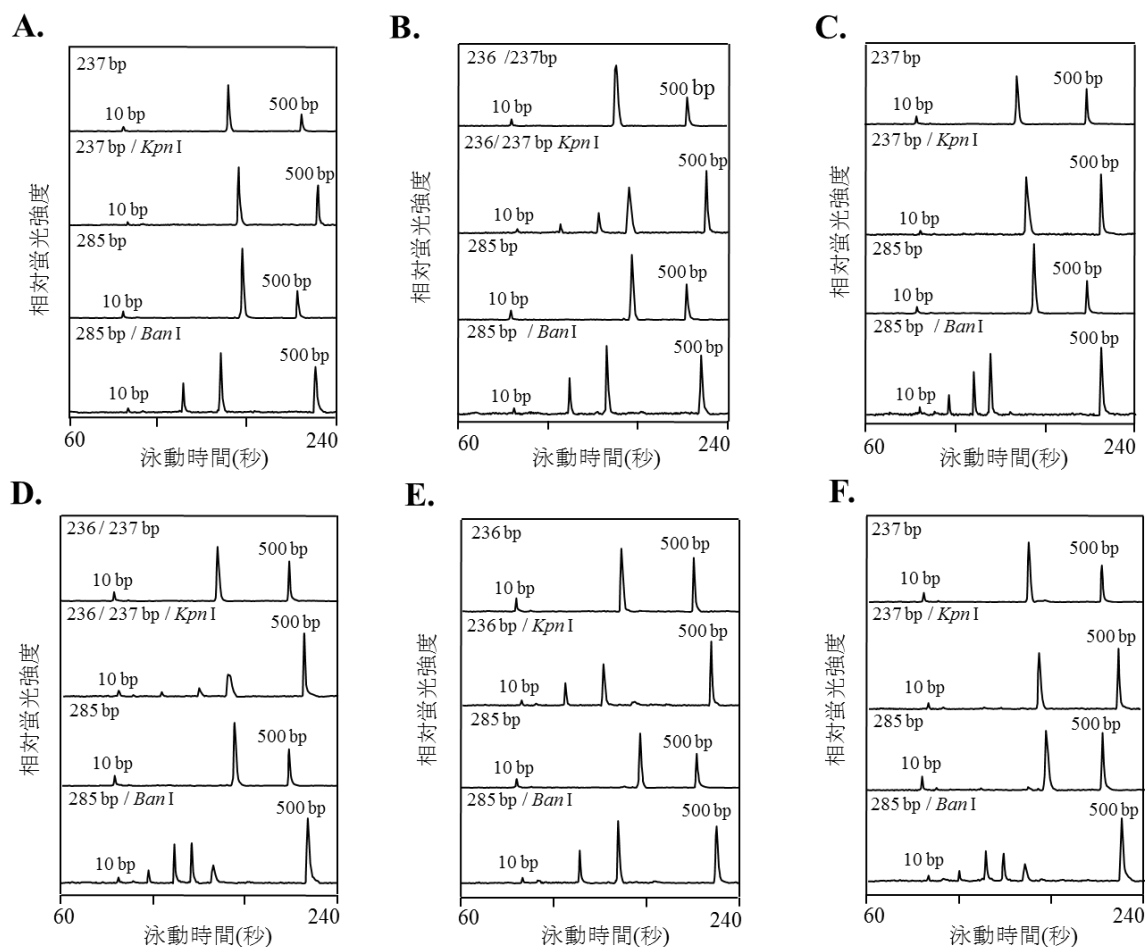


図 2-7 マイクロチップ電気泳動法を用いた RFLP 解析

10 ng/ μ l に調製した 236/237 bp または 285 bp の DNA 断片 2.0 μ l、70 mM MgCl_2 1 μ l、GIBCO DW 4 μ l、20 ng/ μ l 10 bp DNA 断片 1 μ l、10 ng/ μ l 500 bp DNA 断片 1 μ l を試料とし、制限酵素処理前に泳動分析を行い得られたエレクトロフェログラムと、制限酵素処理前の電気泳動分析終了後、*Kpn* I または *Ban* I 1 μ l を SR に添付し SV1210 内で 25°C、20 分インキュベーションしたのち、直ちに電気泳動分析を行い得たエレクトロフェログラムを試料ごとに示した。なお、A は試料 No.1、B は試料 No.2、C は試料 No.3、D は試料 No.4、E は試料 No.5、F は試料 No.6 の結果である。図中には内部標準由来のシグナルピークのみ鎖長を記載した。

表 2-3 マイクロチップ電気泳動による 236/237 bp の DNA 断片の
Kpn I 処理前後の泳動時間および解析された DNA 断片の鎖長

試料No.	制限酵素処理前			制限酵素処理後		
	ピーク No.	泳動時間 (秒)	鎖長 (bp)	ピーク No.	泳動時間 (秒)	鎖長 (bp)
1	1	97.0	10	1	100.0	10
	2	167.6	230	2	175.0	227
	3	217.0	500	3	228.6	500
2	1	96.0	10	1	99.4	10
	2	165.4	231	2	128.4	72
	3	213.6	500	3	154.0	152
				4	174.4	231
				5	226.2	500
3	1	94.6	10	1	96.8	10
	2	161.8	230	2	167.4	227
	3	212.2	500	3	217.6	500
4	1	94.0	10	1	96.6	10
	2	162.0	231	2	124.8	73
	3	209.0	500	3	149.4	155
				4	169.8	236
				5	218.4	500
5	1	95.2	10	1	98.4	10
	2	163.4	231	2	127.6	73
	3	211.8	500	3	151.8	152
				4	222.2	500
6	1	96.2	10	1	99.6	10
	2	165.2	229	2	173.0	226
	3	213.6	500	3	225.6	500

表 2-4 マイクロチップ電気泳動における 285 bp の DNA 断片の
Ban I 処理前後の泳動時間および解析された DNA 断片の鎖長

試料No.	制限酵素処理前			制限酵素処理後		
	ピーク No.	泳動時間(秒)	鎖長 (bp)	ピーク No.	泳動時間(秒)	鎖長 (bp)
1	1	96.4	10	1	99.6	10
	2	177.0	282	2	137.2	96
	3	217.0	500	3	162.4	182
				4	228.6	500
2	1	95.4	10	1	99.8	10
	2	175.6	284	2	134.6	96
	3	213.6	500	3	159.2	182
				4	221.8	500
3	1	94.0	10	1	96.2	10
	2	172.4	284	2	115.4	50
	3	208.2	500	3	132.4	96
				4	143.2	133
				5	217.2	500
4	1	94.6	10	1	97.6	10
	2	173.0	283	2	117.0	50
	3	209.0	500	3	133.8	96
				4	145.0	133
				5	158.6	183
				6	220.0	500
5	1	95.8	10	1	98.4	10
	2	175.8	283	2	136.8	96
	3	211.8	500	3	161.8	181
				4	225.8	500
6	1	96.2	10	1	99.4	10
	2	176.4	283	2	119.4	50
	3	213.6	500	3	136.8	96
				4	148.2	133
				5	161.8	183
				6	225.2	500

2-3 考察

本研究により、市販のマイクロチップ電気泳動装置を用いて、12 試料を同時に RFLP 解析する方法(以下本法)を確立することができた。本法および従来法においては、電気泳動分析に要する DNA 断片の量は 20 ng および 200 ng(制限酵素処理前後の泳動分析にそれぞれ 100 ng 用いる)であり、制限酵素処理条件は 25℃・20 分および 37℃・1 時間、泳動分析に要する時間は 7 分および 1 時間(電気泳動 30 分+エチジウムブロマイド染色 30 分)であった。つまり、従来法と比較して本法においては、使用する試料量は 1/5、制限酵素処理時間は 1/5、電気泳動分析に要する時間は 1/8 と、迅速かつ省サンプルに RFLP 解析を行うことができた。また、12 試料を同時に電気泳動分析するマイクロチップを用いることで、1 枚のマイクロチップにてすべての遺伝子型判定が可能であり、高効率に結果を得ることができた。

今回は、塩濃度が低い条件で制限酵素処理が可能である制限酵素 *Kpn* I および *Ban* I を使用した RFLP 解析系についてマイクロチップ電気泳動法を用いることを検討した。これは、DNA 鎖のシグナルピークが高い塩濃度下で低下すること [25,27] を考慮したためである。将来、さまざま遺伝子多型解析に本法を用いるためには、使用できる制限酵素の種類が制限されないように高い塩濃度下においても電気泳動分析が可能であるマイクロチップ電気泳動の条件を検討しなければならないと考えられる。

また、マイクロチップ電気泳動法を用いた RFLP 解析は既にいくつか報告がなされている [28-32]。中でも Xie ら [32] は、本法と同じく一枚のマイクロチップ上で制限酵素処理及び DNA の電気泳動分析を行うことを報告している。しかしながら、このマイクロチップはガラスとプラスチックの一種であるポリジメチルシロキサンという素材からなるもので、温度制御可能なヒーターを備えた反応場、流量管理のできるポンプそしてマイクロチップ電気泳動を行う部分という複雑な構造であり、制限酵素処理に要する時間も本法より長い 45 分を要している。本法は、市販のマイクロチップ電気泳動装置を用いることで、複雑な構造を持ったマイクロチップは使用せず、泳動ゲルの充填、試料の添付を行った後スイッチ一つで電気泳動分析を行うことができる易操作性という点で先の報告より優れていると考えられる。制限酵素処理においても、短時間はもちろんの

こと、加温せず常温で処理可能であることも操作をより容易にしている。

RFLP を含む遺伝子の多様性は各種疾患における遺伝的要因となりえることから、遺伝子診断は臨床の現場で利用されるようになってきている[33-35]。迅速、省サンプルに、多検体を同時解析可能である本法は、遺伝子診断について POCT を実現する可能性を示していると考ええる。

2-4 実験方法

2-4-1 試薬・装置

日立 SV1210 形マイクロチップ電気泳動装置および SV1210 ソフトウェア Ver.1.6.1 (Hitachi Chemical Co., Tokyo, Japan)

i-チップ 12(Hitachi Chemical Co., Tokyo, Japan)

i-SDNA12 キット(Hitachi Chemical Co., Tokyo, Japan)

PCR Marker (NEB, USA)

Low molecular weight DNA Ladder (NEB, USA)

NoLimit DNA Ladder 10bp & 500bp (Fermentas, Ontario, Canada)

スマイテスト EX-R&D(Nippon Genetics Co.Ltd, Tokyo, Japan)

KOD-plus- ver.2 (TOYOBO, Tokyo, Japan)

プライマー(Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan)

QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan)

Kpn I (TOYOBO, Tokyo, Japan)

Ban I (TOYOBO, Tokyo, Japan)

GIBCO DW (Invitrogen, USA)

GTG Nusieve アガロース (TaKaRa, Kyoto, Japan)

NoLimit DNA Ladder 10bp & 500bp (Fermentas, Ontario, Canada)

その他試薬は市販特級品を用いた。

2-4-2 マイクロチップ電気泳動

マイクロチップ電気泳動は、市販の日立 SV1210 形マイクロチップ電気泳動装置、12 チャンネル型マイクロチップである *i*-チップ 12(図 2-1D)及び 10–500 bp の DNA の分離に適した *i*-SDNA12 キットを用いた。SV1210 はチップリーダーである SV1210 本体と接続されたパソコンからなる。装置に添付されている SV1210 ソフトウェアには、マイクロチップ電気泳動条件の設定、データ解析、データ表示の機能がある。データはゲルイメージ図とエレクトロフェログラムの形で表示可能である。また、SV1210 における DNA 検出は蛍光色素を用いており、赤色半導体レーザを光源とし蛍光を冷却 CCD により検出する(蛍光色素の励起波長は 630 nm であり、測定している蛍光波長は 650 nm である)。

i-SDNA12 キットには蛍光色素、泳動ゲル、10 bp と 500 bp の DNA 断片を含んだ DNA サイズ校正用の内部標準溶液が含まれる。実際の操作の流れは次のようである。蛍光色素を混合した泳動ゲル 20 μ l をウェル G1 にピペットを用いて添加する。続いてこの泳動ゲルを、シリンジを使用しマイクロチャネル内に充填する。そして、ウェル G2-3 及び g1-12 はピペットを使用して蛍光色素を混合した泳動ゲルを 20 μ l 及び 10 μ l 添加し、ウェル G1 にはピペットを使用して蛍光色素を混合した泳動ゲルを追加で 5 μ l 添加する。最後に SR である S1-12 に、試料溶液 10 μ l を添加したのち、SV1210 にこの *i*-チップ 12 をセットしマイクロチップ電気泳動を行う。泳動条件は DNA(short)モード(25 $^{\circ}$ C、導入泳動; 導入電圧 350 V で 120 秒、分離泳動; 分離電圧 1100 V および戻し電圧 350 V で 270 秒)で行い、スタートから 7 分で SV1210 ソフトウェアに解析結果が表示される。なお、試料溶液はキット添付の内部標準溶液 9 μ l と試料 1 μ l を混合し調製することが一般であるが、目的によって組成を変更することも出来る。

2-4-3 ヒト毛髪からのゲノム DNA の抽出

1 検体あたり、毛根鞘細胞のついた約 1.5cm の毛髪を 5 本用いた。本実験では、過去の血液検査等で ABO 式血液型が既知の No.1-6 の 6 人の毛髪よりゲノム DNA を得た。まず、毛髪を PBS buffer で洗浄した。乾燥後、1.5 ml チューブに移し、核酸抽出キット(スマイテスト EX-R&D)を用いてゲノム DNA を抽出した。操作法はキットの使用説明書に従ったが、過去の報告に基づいて第一段階の酵素処理の反応時間を 6 時間、第 2 段階のタンパク溶解液による処理時間を 1 時間とした[10]。なお、血液型は No.1、2 が A 型、No.3、4 が B 型、No.5 が O 型、No.6 が AB 型である。また、ヒト由来の毛髪の提供にあたっては主たる実験操作を行った、独立行政法人 産業技術総合研究所におけるヒト由来試料実験倫理委員会の審査・承認を受け、提供者から書面でインフォームドコンセントを得た。

2-4-4 RFLP 解析に用いる DNA 断片の増幅

RFLP 解析に用いた DNA 断片は、毛髪より得たゲノム DNA を鋳型にした PCR により得た。PCR には TaKaRa PCR Thermal Cycler を用いた。O 対立遺伝子と A 対立遺伝子および B 対立遺伝子の存在を判別するため、codon 87 を含む領域を

KM066(5'-プライマー)およびKM067(3'-プライマー)をプライマーとして236/237 bp の DNA 断片を PCR により得た。また B 対立遺伝子と A 対立遺伝子および O 対立遺伝子の存在を判別するため、codon 176 を含む領域を KM080(5'-プライマー)および KM081(3'-プライマー)をプライマーとして 285 bp の DNA 断片を PCR により得た。プライマーの配列は表 2-5 に示す。反応溶液はゲノム DNA 抽出液 2 μ l、10 \times Buffer for KOD –Plus- Ver.2 2.5 μ l、2 mM dNTPs 2.5 μ l、25 mM MgSO₄ 1.5 μ l、プライマー(それぞれ 5 μ M) 1.5 μ l、KOD –Plus- Ver.2 (1 U/ μ l) 0.5 μ l を用い、GIBCO DW にて全量 25 μ l とした。PCR 反応条件は、94 $^{\circ}$ C で 2 min 加熱し DNA 鎖を解離したのち、94 $^{\circ}$ C 15 sec(熱変性)、65 $^{\circ}$ C 30 sec (アニーリング)、68 $^{\circ}$ C 1 min(相補鎖の合成)を 1 サイクルとし、30 サイクル行った。それぞれの DNA 断片は PCR 後の反応溶液を 4%アガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit を用いてゲル精製した。精製後の DNA 断片の濃度は分光光度計 NanoDrop ND-1000(NanoDrop products, Wilmington, USA)で定量を行った。

表 2-5 PCR に用いたプライマーの配列

プライマー名	配列	領域
KM066	5'-ATGTGGGTGGCACCCCTGCCA-3'	44–63
KM067	5'-ACTCGCCACTGCCTGGGTCTC-3'	280–261
KM080	5'-GTGGCTTTCCTGAAGCTGTTC-3'	1290–1310
KM081	5'-GCCCACGTGGTCGCGGAAGTC-3'	1574–1554

2-4-5 アガロースゲル電気泳動法(従来法)による RFLP 解析

2-4-4 で得られた 20 ng/ μ l に調製した 236/237 bp および 285 bp の DNA 断片 5 μ l、70 mM MgCl₂ 2 μ l、GIBCO DW 4 μ l、*Kpn* I および *Ban* I 1 μ l を 1.5 ml チューブに加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。この際、それぞれの制限酵素に添付される緩衝液の代わりに 70 mM MgCl₂ を用いたのは、制限酵素による DNA の切断に Mg²⁺イオンが必要である[36]が、塩濃度が高いとマイクロチップ電気泳動のシグナルピークが低下すること[25,27]を考慮し、NaCl 非存在下で処理を行うためである。これら制限酵素処理後の DNA 断片を 4%アガロースゲル電気泳動 (100 V、30 分)にて分離泳動したのち、エチジウムブロマイド染色を行った。この際同時に Low molecular weight DNA Ladder を DNA サイズマーカー、20 ng/ μ l

に調製した 236/237 bp および 285 bp の DNA 断片 5 μ l、GIBCO DW 15 μ l を混合した試料を制限酵素処理前の DNA 断片として泳動分析を行った。この結果得られた泳動パターンより各 DNA 断片の鎖長を推定し、表 2-1 に当てはめて遺伝子型の判定を行った。

2-4-6 マイクロチップ電気泳動法による RFLP 解析

RFLP 解析におけるマイクロチップ電気泳動法による泳動分析は 2-4-2 の方法に準じて行った。泳動ゲル及び蛍光色素は *i*-SDNA12 キットに付属したものを用いた。RFLP 解析を行った際の試料溶液の組成は、制限酵素処理前の泳動分析時は 10 ng/ μ l に調製した 236/237 bp または 285 bp の DNA 断片 2.0 μ l、70 mM MgCl₂ 1 μ l、GIBCO DW 4 μ l、20 ng/ μ l 10 bp DNA 断片 1 μ l、10 ng/ μ l 500 bp DNA 断片 1 μ l の合計 9 μ l とした。制限酵素処理前の泳動分析が完了したのち、SV1210 から 12 チャンネル型マイクロチップを取り出し各 SR に制限酵素 *Kpn* I または *Ban* I 1 μ l を加えピペットでおだやかに混和し試料溶液を計 10 μ l とした。その後、このマイクロチップを再度 SV1210 にセットし、SV1210 内にて 25℃で 20 分インキュベーション後、直ちに制限酵素処理後の泳動分析をスタートさせた。遺伝子型の判定については解析された DNA 鎖長から、表 2-1 に当てはめて行った。

2-5 参考文献

- [1] E.S. Lander, L.M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, *et al.*, *Nature*, **409**, 861-921 (2001)
- [2] J.C. Venter, M.D. Adams, E.W. Myers, P.W. Li, *et al.*, *Science*, **291**, 1304-1351 (2001)
- [3] P. Bork, R. Copley, *Nature*, **409**, 818-820 (2001)
- [4] C. Gridelli, F. De Marinis, M. Di Maio, D. Cortinovia, F. Cappuzzo F, T. Mok, *Lung Cancer*, **71**, 249-257 (2011)
- [5] C. Zhang, W. Bao, Y. Rong, H. Yang, K. Bowers, E. Yeung, M. Kiely, *Hum. Reprod. Update*, **19**, 376-390 (2013)
- [6] S.J. Lee, *Front Genet.*, fgene.2012.00318 (2013)
- [7] J.S. Beckmann, M. Soller, *Theor. Appl. Genet.*, **67**, 35-43 (1983)
- [8] J. Sambrook, D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)
- [9] J.C. Lee, J.G. Chang, *J. Forensic Sci.*, **37**, 1269-1275 (1992)
- [10] E. Hosoi, *Jpn. J. Clin. Pathol.*, **43**, 391-396, (1995)
- [11] D.F. Stroncek, R. Konz, M.E. Clay, J.P. Houchins, J. McCullough, *Transfusion*, **35**, 231-240 (1995)
- [12] C. Ladd, M.T. Bourke, C.A. Scherczinger, E.M. Pagliaro, R.E. Gaensslen, H.C. Lee, *J. Forensic Sci.*, **41**, 134-137 (1996)
- [13] Z. Tun, K. Honda, M. Nakatome, M.N. Islam, H. Bai, Y. Ogura, H. Kuroki, M. Yamazaki, M. Terada, C. Wakasugi, *J. Forensic Sci.*, **41**, 1027-1030 (1996)
- [14] A. Villa, F. Drago, R. Misto, F. Molelati, F. Poli, G. Sirchia, *Haematologica*, **81**, 492-496 (1996)
- [15] F. Yamamoto, H. Clausen, T. White, J. Marken, S. Hakomori, *Nature*, **345**, 229-233 (1990)
- [16] F. Yamamoto, J. Marken, T. Tsuji, T. White, H. Clausen, S. Hakomori, *J. Biol. Chem.*, **265**, 1146-1151 (1990)
- [17] F. Yamamoto, S. Hakomori, *J. Biol. Chem.*, **265**, 19257-19262 (1990)
- [18] L. Zhang, F. Dang, Y. Baba, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 1645-1654 (2003)
- [19] M. Kataoka, Y. Fukura, Y. Shinohara, Y. Baba, *Electrophoresis*, **26**, 3025-3031

(2005)

- [20] E. Maeda, M. Kataoka, M. Hino, K. Kajimoto, N. Kaji, M. Tokeshi, J. Kido, Y. Shinohara, Y. Baba, *Electrophoresis*, **28**, 2927-2933 (2007)
- [21] E. Maeda, M. Kataoka, S. Yatsushiro, K. Kajimoto, M. Hino, N. Kaji, M. Tokeshi, M. Bando, J. Kido, M. Ishikawa, Y. Shinohara, Y. Baba, *Electrophoresis*, **29**, 1902-1909 (2008)
- [22] Y. Umemoto, M. Kataoka, S. Yatsushiro, M. Watanabe, J. Kido, R. Kakuhata, T. Yamamoto, Y. Shinohara, Y. Baba, *Anal. Biochem.*, **388**, 161-163 (2009)
- [23] Y. Umemoto, M. Kataoka, S. Yatsushiro, S. Yamamura, T. Ooie, J. Kido, T. Yamamoto, Y. Shinohara, Y. Baba, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **52**, 323-328 (2010)
- [24] Y. Yamaguchi, S. Yatsushiro, S. Yamamura, H. Abe, K. Abe, M. Watanabe, K. Kajimoto, Y. Shinohara, Y. Baba, M. Kataoka, *Analyst*, **136**, 2247-2251 (2011)
- [25] M. Kataoka, S. Inoue, K. Kajimoto, Y. Shinohara, Y. Baba, *Eur. J. Biochem.*, **271**, 2241-2247 (2004)
- [26] J. Sigmon, L.L. Larcom, *Electrophoresis*, **17**, 1524-1527 (1996)
- [27] O. Mueller, K. Hahnenberger, M. Dittmann, H. Yee, R. Dubrow, R. Nagle, D. Ilsley, *Electrophoresis*, **21**, 128-134 (2000)
- [28] I. Nachamkin, N.J. Panaro, M. Li, H. Ung, P.K. Yuen, L.J. Kricka, P. Wilding, J. Clin. *Microbiol.*, **39**, 754-757 (2001)
- [29] J. Qin, Z. Liu, D. Wu, N. Zhu, X. Zhou, Y. Fung, B. Lin, *Electrophoresis*, **26**, 219-224 (2005)
- [30] A. Minucci, E. Delibato, M. Castagnola, P. Concolino, F. Ameglio, C. Zuppi, B. Giardina, E. Capoluongo, *J. Sep. Sci.*, **31**, 2694-2700 (2008)
- [31] K. Watanabe, *J. Pestic. Sci.*, **33**, 249-260 (2008)
- [32] H. Xie, B. Li, R. Zhong, J. Qin, Y. Zhu, B. Lin, *Electrophoresis*, **29**, 4956-4963 (2008)
- [33] D.N. Cooper, J. Schmidtke, *Hum. Genet.*, **73**, 1-11 (1986)
- [34] D.N. Cooper, J. Schmidtke, *Hum. Genet.*, **92**, 211-236 (1993)
- [35] R. Todd, R.B. Donoff, Y. Kim, D.T. Wong, J. Oral, *Maxillofac. Surg.*, **59**, 660-667 (2001)
- [36] K. Yoshikawa, Y. Shinohara, H. Terada, S. Kato, *Biophys. Chem.*, **27**, 251-254 (1987)

第3章 マイクロチップを用いた

血中バイオマーカー測定法の確立

3-1 緒言

生体内に存在する液体である体液の中で、体内をめぐる血液は生体を構成する細胞が生きていくために重要な媒質である。この血液中には体内の各種組織より分泌された代謝産物が多く含まれており、採血を行ってこれらの測定を行うことで体内の状態をうかがい知ることができる。特に生体の生理的・病理的状态を示すタンパク質などはバイオマーカーとよばれ、バイオマーカーの測定を行うことで健康状態の把握や疾患の診断治療に役立てることが可能である[1-3]。バイオマーカーとなるタンパク質の測定時には免疫学的手法がよく用いられるが、なかでも2つの抗体を利用し分析対象となるタンパク質を測定するサンドイッチELISA法は、その特異性の高さおよび感度のよさから頻用されている[4, 5]。バイオマーカー測定時は使い捨て可能なプラスチック製の96穴のマイクロタイタープレート(以下単に96穴プレートという)を用いて行うことが多いが、その流れを図3-1に示した。検出時の標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ(horseradish peroxidase; HRP)、ビオチン、蛍光標識などがよく用いられる。サンドイッチELISA法の一連の操作において、一般に捕獲抗体(以下本稿では一次抗体と呼ぶ)、試料、標識抗体(以下本稿では二次抗体と呼ぶ)はいずれも容量として50 μ l程度使用する[6]。また、一次抗体、二次抗体を利用した抗原抗体反応にそれぞれ2時間以上必要であることが多い。このため、サンドイッチELISA法は高い特異性と感度を持ち合わせているが、結果を得るまでに時間がかかり測定に急を要する場合に適応が難しいという欠点が存在する。

POCTが注目されていることは1-2で触れたが、マイクロチップを利用することでPOCTに応用できる迅速な化学的、生物学的測定法[7-10]だけでなく、免疫学的測定法もいくつか報告されている[11-19]。これらの測定法はマイクロチップを利用することで、迅速、省サンプル、高感度、簡易といった特徴を持つ。

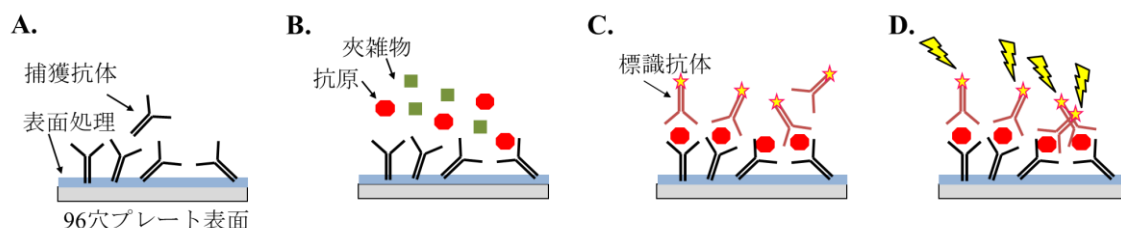


図 3-1 サンドイッチ ELISA 法の原理

(A) 検出対象のタンパク質を認識する捕獲抗体を 96 穴プレート表面に吸着させ固定化する。この際プレートの表面には疎水性を高めたり、親水性を高めたりする処理がなされているものを利用することが多い。

(B) 試料を加え捕獲抗体と検出対象のタンパク質間の抗原抗体反応を行う。

(C) 対象のタンパク質を認識する標識抗体を作用させ、捕獲抗体によりプレートに固定化された検出対象のタンパク質との抗原抗体反応を行う。

(D) 標識抗体の存在量を測定することで、抗原の存在量を知る。

また、既に報告されているマイクロチップを用いた免疫学的測定法のなかにはサンドイッチ ELISA 法の原理を利用しているものも存在するが、一次抗体をマイクロビーズに固定化したうえで、ダムのような構造を持ったマイクロチャネルを利用してマイクロビーズの動きを制御して行う手法である[14, 16-19]。この場合、マイクロチャネルの構造が複雑になる欠点がある。近年、日常生活ではプリンターに多用されるインクジェット技術を用いて、ナイロンメンブラン上に抗体を吐出・固定化し、免疫学的測定を行った報告がなされている[20]。また、電力で変形するピエゾ素子を用いて、抗体を含んだ微量な溶液を 150 μm 程度の大きさで正確に配置できるインクジェット技術も報告されている[21]。そこでインクジェット技術を用いてマイクロチャネルの特定部位に直接一次抗体溶液を吐出・固定化することで、複雑な構造を持たないマイクロチャネル内でもサンドイッチ ELISA 法の原理に基づいた免疫学的測定が可能になるのではないかと考え、本研究に取り組んだ。

本研究では、次のような実験系を用いた。①サンドイッチ ELISA 法における測定対象として、I 型プロコラーゲン C 末端ペプチド(carboxyterminal propeptide of type I procollagen または procollagen type I C-peptide: PICP)を選択した。PICP は体内の I 型コラーゲンの合成時に生成するペプチドで、PICP の血中濃度は骨形

成に関連することが知られている[22]ことから、骨粗鬆症や前立腺癌の骨転移のバイオマーカーとして臨床でも使用されている。また、既に PICP の 96 穴プレートを用いたサンドイッチ ELISA 法による測定系は確立、市販されている。今回はタカラバイオ社の Procollagen type I C-peptide (PIP) EIA Kit を使用した。なお、このサンドイッチ ELISA キットでは、一次抗体はあらかじめ 96 穴プレートの底面に固定化された状態でキット化されており、抗原抗体反応時には図 3-1 に示したように抗原と二次抗体は別々に作用させるのではなく同時に 96 穴プレートに加え 37 °C、3 時間反応を行う。マイクロチャネル内での抗原抗体反応については、このキットと同じ一次抗体、二次抗体、抗原を利用した。②ピエゾ素子を利用したピエゾ方式のインジェット装置としては、クラスターテクノロジー社より販売されているパルスインジェクターを用いた。パルスインジェクターでは、ピエゾ素子にかける駆動波形、駆動電圧、繰り返し周波数を操作することで安定した量の溶液を液滴として吐出することができる。本研究では、駆動電圧 14 V、駆動波形 C、繰り返し周波数 20 Hz、を用いて 1 滴あたり 65 pl の液滴を吐出している。③用いたマイクロチップは、住友ベークライト社製ポリマー表面処理済み環状ポリオレフィン製を用いた。タンパク質のアミノ基に結合する p-ニトロフェノールエステルを含んだポリマーを処理した、ポリマー表面処理後のマイクロチップ表面には、なにも処理を行っていないマイクロチップ表面より効率的に抗体を固定化できる。

3-2 結果

3-2-1 マイクロチャネル内での抗原抗体反応による

PICP の検出およびその再現性

私の所属した研究室の過去の実験にて、住友ベークライト社のポリマー表面処理を行ったマイクロチャネルのチャネル壁面全面に一次抗体を固定化し抗原抗体反応を行った場合、抗原である PICP と二次抗体を混合した溶液を作用させる時間に比例し得られる化学発光のシグナルが大きくなること、そしてその反応時間を 30 分に短縮してもその検量線に直線性が見られることが示されている(結果は示さない)。よって、パルスインジェクターを用いて、マイクロチャネルの底面の特定位置に一次抗体溶液を吐出・固定化してマイクロチャネル内における抗原抗体反応を行う場合も反応時間を 30 分として PICP の検出を行うこととした。なお、パルスインジェクターにより一次抗体を吐出する際は、マイクロチャネルは閉鎖した流路の形状ではなく、幅 300 μm 、深さ 100 μm の開放された溝の状態である。この溝の底面にパルスインジェクターにより一次抗体を吐出し、アクリルシートをはり溝にふたをしてから実験操作を行う(図 3-2)。この際、吐出する液滴数は、図 3-2 中に示すようにほぼマイクロチャネル幅の液滴となるように 100 滴とした。

同一のマイクロチャネル内の特定の 3 か所に、100 滴ずつ一次抗体溶液を吐出・固定化し、0、150、300、600 ng/ml の PICP を抗原として抗原抗体反応を行った。この結果、マイクロチャネル底面の特定位置に一次抗体を吐出・固定化した場合についても、抗原抗体反応時間を 30 分として PICP の検出が可能であった(図 3-3A)。このときの各液滴における化学発光強度を数値化し、結果を表 3-1 に示したが、同一のマイクロチャネル内における独立した 3 点の化学発光強度の相対標準偏差は、0、150、300、600 ng/ml の PICP についてそれぞれ 4.2、6.0、8.1、7.5%であり、各濃度において同一のマイクロチャネル内で複数点の検出を行うことが可能であることが示された。続いて、3 つの異なるマイクロチャネル間での再現性について、同様に検討を行った結果、化学発光強度の相対標準偏差は、0、150、300、600 ng/ml の PICP についてそれぞれ 4.0、5.7、8.1、8.8%であった(表 3-2)。これより、異なるマイクロチャネル間における化学発光強度

を比較可能であることが示された。

以上から、マイクロチャネルの特定位置に一次抗体を固定化し、マイクロチャネル内での抗原抗体反応を利用することで、従来の ELISA 法では抗原抗体反応に 3 時間要していたところ、30 分と時間の短縮を行っても PICP の特異的検出が可能であるサンドイッチ ELISA 法の構築が可能と示された。以下、マイクロチャネルの特定位置に一次抗体を固定化し、マイクロチャネル内で行う抗原抗体反応を利用したサンドイッチ ELISA 法をマイクロチップ法と呼ぶ。

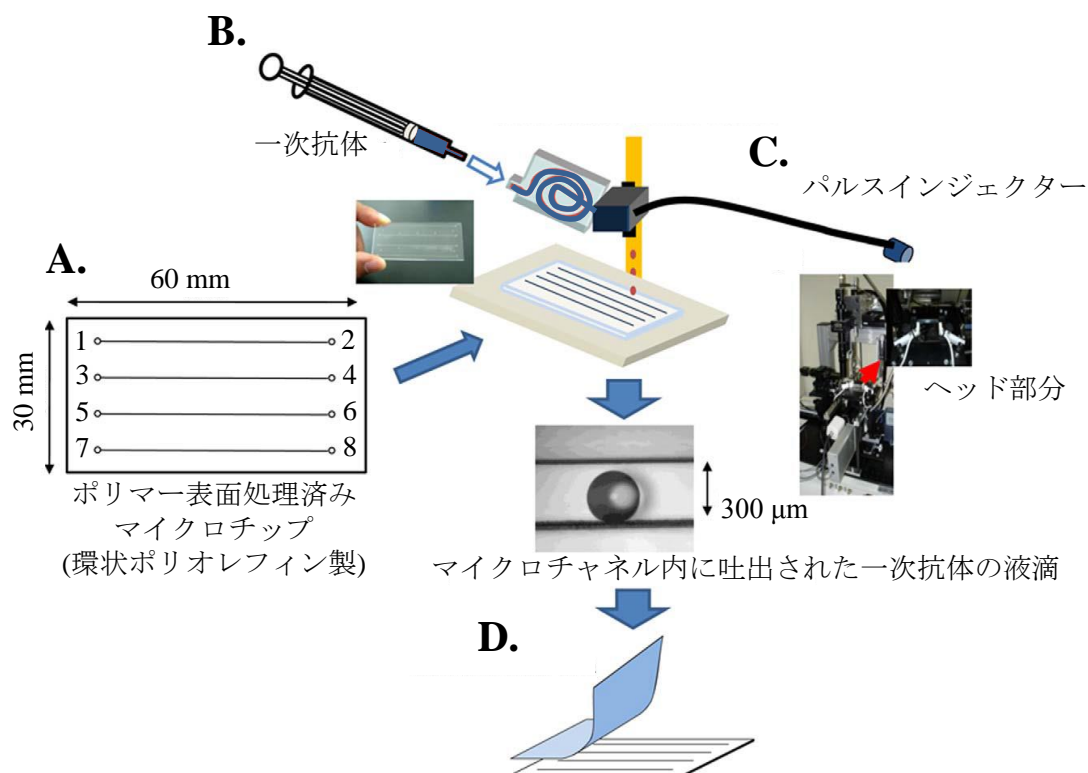


図 3-2 今回の解析で用いたマイクロチップの作成

0.1 mg/ml に調製した抗 PICP 一次抗体溶液をパルスインジェクター(C)のヘッド部分に装着するカートリッジに注入し、1 滴あたり 65 pl の一次抗体溶液をポリマー表面処理済みマイクロチップ(A)に形成したマイクロチャネル底面の特定位置に吐出する(B)。その後、アクリルシートを貼付し蓋をする(D)。マイクロチップに液体を流し込む際は、A に示した 1、3、5、7 のポートから行い、排出は 2、4、6、8 のポートから行う。

3-2-2 マイクロチップ法の定量性

同一のマイクロチャンネル内および異なるマイクロチャンネル間において、検出時に得られる PICP 特異的な化学発光強度は良好な再現性を示すことがわかった。よって、これらデータを利用し、マイクロチャンネル内の特定位置に一次抗体を固相化した場合に得られた化学発光強度を用いて検量線の作成が可能であるか検討した。PICP の濃度を横軸に、表 3-1、3-2 に示した 0、150、300、600 ng/ml の各濃度 6 点の化学発光強度の平均値を縦軸にグラフを作成した。この結果、PICP 濃度 0 - 600 ng/ml の範囲で相関係数 $R^2 = 0.991$ と相関性の高い直線の検量線が得られた(図 3-3B)。また、この検量線の濃度範囲は臨床で PICP を測定するにあたってでも利用できるものである[23, 24]。よって、マイクロチップ法においても、従来の 96 穴プレートを用いた場合と同様に、PICP の定量が可能であると考えられる。なお、検出限界は通常 0 ng/ml PICP におけるブランク値を多数測定し、その平均値に標準偏差の 3.29 倍を加えた数値とすることが多い[25]。しかし今回はこの検量線において検出限界は x 切片から 4.7 ng/ml と推定された。この数値は実際に低濃度領域の PICP をマイクロチップ法で測定した際に 0 ng/ml における化学発光強度と有意差のある化学発光強度が得られる 5 ng/ml(結果は示さない)とほぼ一致していることから、推定の検出限界として 4.7 ng/ml とした。

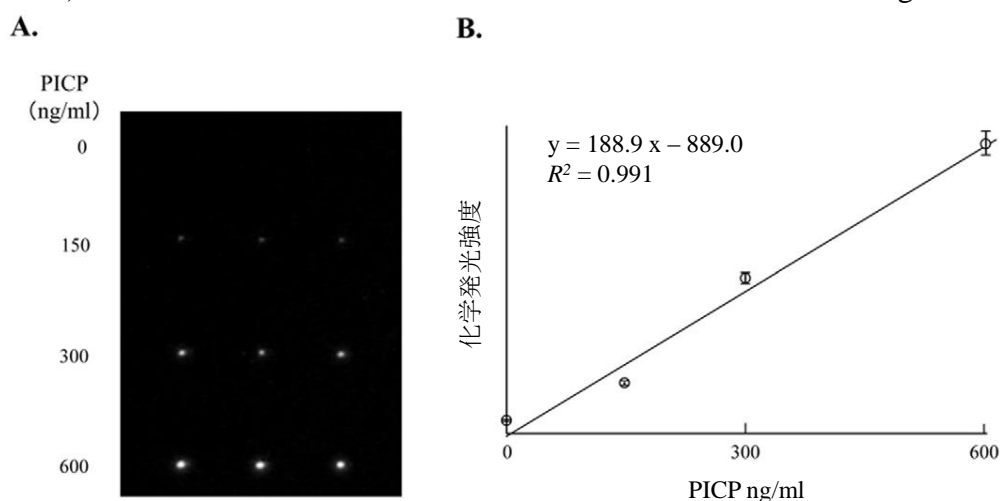


図 3-3 マイクロチップ法による PICP の検出

(A)1 つマイクロチャンネル内の特定の 3 か所に 100 滴ずつ一次抗体溶液を吐出・固定化し、0、150、300、600 ng/ml の PICP を抗原として、検出を行った際に得られる化学発光を撮影した。露光時間は 15 分。

(B)横軸に PICP 濃度、縦軸に数値化した化学発光をとり作成した検量線を示す。この検量線を作成する際には、表 3-1、3-2 の数値を利用し最小二乗法にて近似直線を得た。

表 3-1 同一マイクロチャネル内における再現性

同一のマイクロチャネル内の特定の 3 か所に一次抗体を吐出・固定化し、PICP の検出を行った場合の再現性を示す。化学発光を検出後、数値化した。

液滴 No.	PICP 濃度 ng/ml			
	0	150	300	600
1	4164	19292	61840	116188
2	3932	19304	62780	102992
3	3840	17352	54020	118584
平均	3979	18649	59547	109255
相対標準偏差(%)	4.2	6.0	8.1	7.5

表 3-2 異なるマイクロチャネル間での再現性

異なる 3 つのマイクロチャネル内に一次抗体を吐出・固定化し、PICP の検出を行った場合の再現性を示す。化学発光を検出後、数値化した。

チャネル No.	PICP 濃度 ng/ml			
	0	150	300	600
1	4305	16661	52275	111513
2	4125	17923	65007	128005
3	3979	18649	59547	109255
平均	4136	17744	59943	116258
相対標準偏差(%)	4.0	5.7	8.1	8.8

3-2-3 マイクロチップ法によるヒト血清中 PICP の測定

これまでの結果より、マイクロチップ法は従来の 96 穴プレートを用いた ELISA 法と同等以上の感度で血中 PICP 濃度の測定を行うことが可能であることが示唆された。そこで、実際に 6 人のボランティアより提供をうけたヒト血清サンプルを用いて、従来法およびマイクロチップ法により血中 PICP の測定を行い、その測定値について比較を行った。横軸に従来法による測定値を、縦軸にマイクロチップ法における測定値をとり作成したグラフを図 3-4 に示した。この結果、従来法およびマイクロチップ法における両測定値の相関係数 R^2 は 0.9914 であり、非常に高い相関を示していた。また、得られた近似曲線がほぼ $y = x$ に近い数式

$y = 0.941x + 3.842$ で表されることから、両測定法における測定値には差がないことが示された。また、それぞれ 3 つの検体について 1 日に 4 回の実験を行って日内変動を、4 日間にわたり実験を行い日差変動を検討した(表 3-3)。この結果、日内変動の変動係数は 3.2–9.8%($n = 4$)、日差変動の変動係数は 4.4–6.8%($n = 4$) とキットと同程度の良好な再現性を示した。以上より、特定の位置に一次抗体を吐出、固相化したマイクロチャネル内における抗原抗体反応を利用したマイクロチップ法によって、従来法と同等に血清サンプル中の PICP の測定が可能であるといえる。なお、マイクロチップ法で測定を行う場合に使用する試薬量は、マイクロチャネルに溶液を満たした場合の体積が 1.8 μl であることから、血清サンプル量は 0.4 μl 、二次抗体量は 2 μl とした。

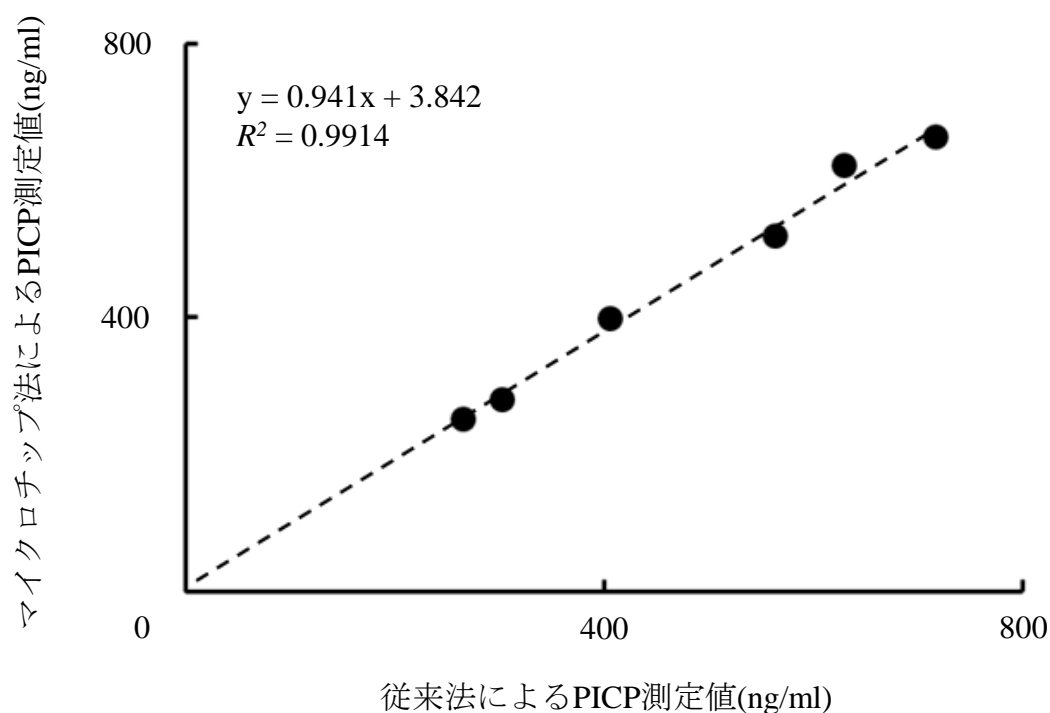


図 3-4 マイクロチップ法と従来法による血清 PICP 測定値の相関

横軸に ELISA キットを用いた PICP 測定値、縦軸にマイクロチップ法における PICP 測定値を取り作成したグラフを示す。点線の近似直線は最小二乗法より得た。

表 3-3 マイクロチップ法による測定値の日内・日差変動

試料 No.	PICP	
	平均値±標準偏差 ng/ml	変動係数(%)
日内変動、 $n = 4$		
1	327.4±10.3	3.2
2	479.2±47.2	9.8
3	623.7±46.4	7.4
日差変動、 $n = 4$		
4	874.5±45.0	5.2
5	580.7±39.7	6.8
6	657.9±28.9	4.4

3-3 考察

本研究により、従来の ELISA 法の原理に基づいた抗原抗体反応をマイクロチャンネル内で行うことで、①抗原抗体反応時間は 3 時間から 30 分と 1/6、②用いた血清サンプル量は 20 μl から 0.4 μl と 1/50、③用いた二次抗体量は 100 μl から 2 μl と 1/50、④検出感度は 10 ng/ml から 4.7 ng/ml と 2 倍と、迅速、省サンプル、高感度に血中 PICP を測定するマイクロチップ法の確立が可能になった。

マイクロチャンネル底面の特定位置に一次抗体を吐出・固定化する際に利用したインクジェット技術において、カートリッジに充填された液体をヘッドのノズルより吐出する際に用いられる方法は、今回用いたピエゾ素子によるピエゾ方式ほかに、熱を利用するサーマル方式が広く知られている。サーマル方式はバブル方式と呼ばれることもあるが、この方式の場合、ヒーターを用いて充填された液体に熱をかけ気泡を発生させ、その圧力で液体をノズルから押し出すことで液体を吐出する。一方、ピエゾ方式では、電力で変形するピエゾ素子の圧力を用いて液体を吐出している[26]。一般に市販されているインクジェットプリンターの場合、サーマル方式の方が高解像度であるといわれているものの、吐出の際にヒーターにより熱をかけるため、タンパク質などの熱によって変性がおこる生体物質の吐出には影響がある可能性が指摘されている[27]。一方で、ピエゾ方式においても、吐出時に高い圧力が生体物質を含んだ溶液にかかることでその機能が損傷される可能性が指摘されている[20, 21, 28, 29]。特に、ナイロンメンブラン上にピエゾ方式のインクジェット技術で抗体を吐出、固定化した報告では、抗体が損傷されたためか定量性が見られなかった[20]。しかしながら、今回の実験で一次抗体を吐出、固定化する際に用いた、ピエゾ方式のパルスインジェクターでは、表 3-1 に示したように液滴間での再現性が良いこと、さらに図 3-2B に示したように検量線の作成ができることから、吐出・固定化時に一次抗体の損傷はないと考えられ、マイクロチップを用いた ELISA 法への利用が可能であるといえる。

抗原抗体反応を従来の 3 時間から 30 分と 1/6 に短縮できたことは、マイクロ空間の効果であると考えられる。マイクロ空間における大きな特徴は、分子の拡散距離つまり拡散時間が短いことがあげられる。たとえば、拡散係数 0.00001

$\text{cm}^2/\text{秒}$ のイオンの移動を考えると、拡散時間は拡散距離の2乗を拡散係数で除することで得られるが、1 cm の移動には1 日ほどかかる一方で、100 μm の移動には数十秒を要するのみである。この移動時間の差はマクロスケールに置き換えると攪拌を行っているに相当すると考えてもよい[30]。水溶液などの媒質内で結合や分解などの反応が起こる際には反応分子の衝突が起こりやすいほど反応速度は大きくなるが、マイクロ空間においては分子の拡散距離および拡散時間が非常に小さいために衝突が起こりやすくなり反応速度が大きくなるのである。マイクロビーズをマイクロチャネル内に充填し行った抗原抗体反応を用いた手法において、96 穴プレートにおける反応時間の1/90 の時間で測定できているが[18]、今回確立したマイクロチップ法と比べて、直径 41.7 μl のマイクロビーズをマイクロチャネル内に充填することで抗原や二次抗体の拡散距離を更に小さくできたことに由来すると思われる。しかしながら、マイクロビーズを用いる方法においては、ビーズの操作のためにマイクロチャネルにダムを作るなどの工夫が必要になる。今回確立したマイクロチップ法は、パルスインジェクターにより直線形状のマイクロチャネル内の特定部位に一次抗体を吐出・固定化するものであり、1 つのマイクロチャネル内で、図 2-3A に示したように複数の液滴について独立した測定が可能である。これは、吐出、固定化する一次抗体の種類を変えることで、1 つのマイクロチャネル内において、複数のバイオマーカーの測定の可能性を秘めている。結果は示さないが、実際に 3 種類の血中バイオマーカーを 1 つのマイクロチャネル内の抗原抗体反応により検出することに成功している。今回確立したマイクロチップ法は、抗体の種類を変更すれば、さまざまなバイオマーカーの測定に使用できる方法であり、今後のさらなる研究により血中バイオマーカー測定における POCT 実現が期待される。

3-4 実験方法

3-4-1 試薬、装置

環状ポリオレフィン製マイクロチップ(SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd., Tokyo, Japan)

ポリマー表面処理 BS-X2321(SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd. , Tokyo, Japan)

アクリルシート(アクリル厚み 33 μm 、粘着剤厚み 10 μm) (TOYO INK MFG. CO., LTD., Tokyo, Japan)

マウス抗ヒト PICP 抗体 PC8-7(TAKARA BIO INC., Shiga, Japan)

Human Procollagen Type I C-peptide (PIP) (TAKARA BIO INC., Shiga, Japan)

HRP 標識マウス抗ヒト PICP 抗体 PC5-5(TAKARA BIO INC., Shiga, Japan)

Procollagen type I C-peptide (PIP) EIA Kit (Precoated) (TAKARA BIO INC., Shiga, Japan)

固相液(SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd., Tokyo, Japan)

パルスインジェクター(Cluster Technology Co., Ltd., Osaka, Japan)

ブロッキング A 液、B 液(SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd., Tokyo, Japan)

SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (PIERCE)

ATTO Light-Capture (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)

CS アナライザー ver2.0 (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)

その他試薬は市販特級品を用いた。

3-4-2 パルスインジェクターを用いたマイクロチャネル底面への 一次抗体の吐出・固定化

凍結乾燥品である 0.1 mg/vial のマウス抗ヒト PICP 抗体 PC8-7(一次抗体)に MQ 水 0.1 ml を加え、1 mg/ml とする。この抗体溶液 50 μl に 450 μl の固相液を加え、10 倍希釈し、最終濃度 0.1 mg/ml とする。この 0.1 mg/ml 一次抗体溶液をパルスインジェクターのヘッドに装着するカートリッジに充填し、ポリマー表面処理済みのオープンなマイクロチャネル底面の特定部位に吐出する。この際の吐出条件は、駆動電圧 14 V、駆動波形 C、繰返し周波数 20 Hz、液滴容積 65 pl とした。抗体溶液を吐出後、室温で 4 時間放置してマイクロチャネル底面に抗体を

固定化する。なおこの間にアクリルシート(BT-1)で蓋をする。

3-4-3 マイクロチャネル内の抗原抗体反応を利用した PICP の検出

一次抗体を吐出・固定化したマイクロチップのマイクロチャネルにブロッキング液(A 液 : B 液 = 100 : 1 の比率で使用の直前に混合する)を、ピペットを使用して流し込み、室温で一時間インキュベーションする。その後、ブロッキング液をシリンジの空気圧にて排出後する。引き続いて、洗浄液(9.57 mM PBS(pH7.35-7.65)、0.05 % Triton X-100)を流し込み、シリンジにて排出する洗浄操作を 3 回行う。各濃度に希釈した Human Procollagen Type I C-peptide (PICP 標準品)もしくは PBS 緩衝液で 5 倍に希釈した血清サンプル 0.4 μ l と HRP 標識マウス抗ヒト PICP 抗体 PC5-5(二次抗体) 2 μ l を混合した溶液をマイクロチャネル内にピペットを利用して流し込み、室温で 30 分抗原抗体反応を行う。この後、抗原抗体溶液をシリンジで排出後、3 回洗浄を行い、発色液をマイクロチャネル内に満たしたのち、生じる化学発光を ATTO Light Capture にて検出する。検出した化学発光は CS アナライザーを用いて数値化した。

3-4-4 ヒト全血からの血清分離

健康なボランティアより静脈穿刺にて提供を受けた全血 10 ml を 15 ml 遠心管に加え、4 $^{\circ}$ C、800 \times g、5 分、遠心分離して得た上清を血清サンプルとした。血清サンプルは、1.5 ml チューブに適量分注したうえで -80 $^{\circ}$ C で保存した。

これら血清サンプルは全血採取を行った国立大学法人 徳島大学、実験操作を行った独立行政法人 産業技術総合研究所それぞれのヒト由来試料実験倫理委員会の審査・承認を受け、提供者から書面でインフォームドコンセントを得た。

3-4-5 ELISA キットを用いた従来法での PICP の検出

Procollagen type I C-peptide (PIP) EIA Kit 添付のプロトコルに基づいて次の流れで行った。なお、測定は 2 重検定で行った。初めに、一次抗体であるマウス抗ヒト PICP 抗体 PC8-7 があらかじめ固定化された 96 穴プレートの各ウェルに HRP 標識マウス抗ヒト PICP 抗体 PC5-5 を 100 μ l ずつ加えた後、あらかじめ調製した 0、10、20、40、80、160、320、640 ng/ml Human Procollagen Type I C-peptide

(PICP 標準品)及び5倍希釈した血清サンプルを 20 μ l ずつ各ウェルに加え、37 $^{\circ}$ C で 3 時間反応する。この際の PICP および血清の希釈はキット添付の Sample Diluent を用いて行う。反応後、プレート内の抗原抗体溶液をすて PBS 緩衝液 で 4 回洗浄後、Substrate Solution(3,3',5,5'- テトラメチルベンジジン溶液; TMBZ) を 100 μ l ずつ各ウェルに加え、室温で 15 分間反応させる。続いて Stop Solution を 100 μ l ずつ、Substrate Solution(TMBZ)を入れた順番に各ウェルに加え反応を停止させた後よく混和する。蒸留水を対照としてゼロ調節し、マイクロプレートリーダー(Infinite 200, TECAN Group Ltd., Männedorf, Switzerland)にて吸光度 $A_{450/640}$ を測定する。得られた吸光度をもとに、PICP 濃度を横軸に、吸光度を縦軸に検量線を作成し、サンプルの吸光度から対応する PICP を算出する。なお、本キットの検出限界は 10 ng/ml、日内変動の変動係数は 4.5–7.4%($n = 16$)、日差変動の変動係数は 4.3–6.3%($n = 3$)である。

3-5 参考文献

- [1] S. Hu, J.A. Loo, D.T. Wong, *Proteomics*, **6**, 6326–6353 (2006)
- [2] L. Thadikkaran, M.A. Siegenthaler, D. Crettaz, P.A. Queloz, P. Schneider P, *et al.*, *Proteomics*, **5**, 3019–3034 (2005)
- [3] N.L. Anderson, N.G. Anderson NG, *Mol. Cell Proteomics*, **1**, 845–867(2002)
- [4] T. Porstmann, S.T. Kiessig, *J. Immunol. Methods*, **150**, 5–21(1992)
- [5] A. Voller, A. Bartlett, D.E. Bidwell, *J. Clin. Path.*, **31**, 507–520 (1978)
- [6] J.A. Smith, *Short Protocols in Molecular Biology. 3rd ed*, In: F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K Struhl K, eds. John Wiley & Sons, Inc., 11.9-11-11(1995)
- [7] E. Maeda, M. Kataoka, M. Hino, K. Kajimoto, N. Kaji, M. Tokeshi, J. Kido, Y. Shinohara, Y. Baba, *Electrophoresis*, **28**, 2927-2933 (2007)
- [8] E. Maeda, M. Kataoka, S. Yatsushiro, K. Kajimoto, M. Hino, N. Kaji, M. Tokeshi, M. Bando, J. Kido, M. Ishikawa, Y. Shinohara, Y. Baba, *Electrophoresis*, **29**, 1902-1909 (2008)
- [9] M.R. Mohamadi, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba, *Anal.Chem.*, **79**, 3667–3672 (2007)
- [10] Y. Tanaka, K. Sato, T. Shimizu, M. Yamato, T. Okano T, *et al.*, *Biosens Bioelectron*, **23**, 449–458 (2007)
- [11] T. Ohashi, K. Mawatari, K. Sato, M. Tokeshi, T. Kitamori, *Lab Chip*, **9**, 991–995 (2009)
- [12] T. Tachi, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba, *Anal. Sci.*, **25**, 149–151 (2009)
- [13] T. Tachi, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba, *Lab Chip*, **9**, 966–971 (2009)
- [14] K. Sato, K. Mawatari, T. Kitamori, *Lab Chip*, **8**, 1992–1998 (2009)
- [15] T. Yasukawa, M. Suzuki, T. Sekiya, H. Shiku, T. Matsue, *Biosens Bioelectron*, **22**, 2730–2736 (2007)
- [16] K. Sato, M. Yamanaka, T. Hagino, M. Tokeshi, H. Kimura, *et al.*, *Lab Chip*, **4**, 570–575 (2004)
- [17] K. Sato, M. Yamanaka, H. Takahashi, M. Tokeshi, H. Kimura, *et al.*, *Electrophoresis*, **23**, 734–739 (2002)

- [18] K. Sato, M. Tokeshi, H. Kimura, T. Kitamori, *Anal. Chem.*, **73**, 1213–1218 (2001)
- [19] K. Sato, M. Tokeshi, T. Odake, H. Kimura, T. Ooi, *et al.*, *Anal. Chem.*, **72**, 1144–1147 (2000)
- [20] T.N. Stewart, B.E. Pierson, R. Aggarwal, R.J. Narayan, *Biotechnol. J.*, **4**, 206–209 (2009)
- [21] M.S. Hasenbank, T. Edwards, E. Fu, R. Garzon, T.F. Kosar, *et al.*, *Anal. Chim. Acta.*, **611**, 80–88 (2008)
- [22] J. Ristell, J. Melkko, S. Niemi, L. Ristell, *Calcif. Tissue Int.*, **49**, S24–S25 (1991)
- [23] A.M. Parfitt, L.S. Simon, A.R. Villanueva, S.M. Krane, *J. Bone Miner Res.*, **2**, 427–436 (1987)
- [24] K. Kohda, N. Ito, M. Ohwada, K. Morita, N. Watanabe, *et al.*, *Gut*, **32**, 624–629 (1991)
- [25] 上本 道久, *ぶんせき*, 216-221, 2010
- [26] J. Merrin, S. Leibler, J.S. Chuang, *PLoS ONE*, **7**, e663 (2007)
- [27] L.R. Allain, D.N. Stratis-Cullum, T. Vo-Dinh, *Anal. Chim. Acta.*, **518**, 77–85 (2004)
- [28] K. Abe, K. Suzuki, D. Citterio, *Anal. Chem.*, **80**, 6928–6934(2008)
- [29] A. Doraiswamy, T.M. Dunaway, J.J. Wilker, R.J. Narayan, *J. Biomed. Mater Res. B Appl. Biomater.*, **89**, 28–35 (2009)
- [30] K. Sato, A. Hibara, M. Tokeshi, H. Hisamoto, T. Kitamori, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **55**, 379-391(2003)

第4章 総括

近年、数 cm 角のガラスやプラスチック基板上に、従来試験管などで行われてきた化学分析や生物化学的解析手法を集積し、迅速、省試薬、高感度、小型化を目指した μ -TAS の実現に向けて多くの研究がなされている。特に、医療の分野では患者の傍らで行う POCT への応用が期待されている。しかし、一部の項目で実現されつつある現状の POCT では、その測定項目が限られていることや、定性的測定が多いことが問題となっている。これらを背景として、本研究では μ -TAS を構成するマイクロ流体デバイスの一つである、プラスチック基板上にマイクロチャネルを形成したマイクロチップを用いて、2つの方向性から新規の生体高分子の分離分析法の確立を目指した。本章では得られた結果について要約し、それぞれの方法について今後の展望を述べる。

マイクロチップ電気泳動装置を用いた制限酵素断片長多形マルチ解析法の確立(第2章)

私の所属した研究室において、既に市販されているマイクロチップ電気泳動装置をさまざまな分子生物学的解析法に応用する研究がなされ、これまでに、オンチップでの制限酵素処理およびその逐次解析、ミトコンドリア膜電位の測定、試験管内 RNA 合成反応のモニタリング、DNA ライゲーション反応の解析、血糖測定、血中アミラーゼ測定、RNase Protection Assay を報告している[1-7]。そこで、本研究では、マイクロチップ電気泳動装置のさらなる汎用性の拡大を目的に、オンチップでの制限酵素反応を利用することで、遺伝子多型解析に用いられる制限酵素断片長多形(RFLP)解析を、マイクロチップ電気泳動装置を用いて行うことを検討した。この結果、マイクロチップ電気泳動装置を用いることで、アガロースゲル電気泳動を用いた従来法と比較して、サンプル量は 1/10、制限酵素処理時間は 1/3、電気泳動分析に要する時間は 1/10 と迅速、省サンプルに RFLP 解析結果を得ることができた。またさらに、マイクロチップによる電気泳動分析を、複数のマイクロチャネルが並列化されたマイクロチップを用いることで、同時に多検体の RFLP マルチ解析を可能とした。

現在の臨床検査で利用される遺伝子多型解析においては、POCT は実現されておらず、結果を得るまでに数日を要する。RFLP 解析は制限酵素認識部位を利用

するという点から、すべての遺伝子多型の解析には適応できないが、ABO 式血液型の判定以外に薬物代謝酵素 CYP2C9 や CYP2C19 の遺伝子多型の判定などに利用されており [8-10]、今回確立したマイクロチップ電気泳動装置を用いた RFLP 解析の適応拡大が期待される。しかしながら RFLP 解析を μ -TAS の概念に則り POCT に適応するならば、本法は制限酵素処理および電気泳動分析の迅速化を図ることに成功したのみであり、その前段階であるゲノム DNA の抽出および PCR による目的領域の増幅については別途マイクロ流体デバイスを用いた手法の研究が必要である。例えば、Chu ら [11] によりマイクロ流体デバイスを用いて頬の粘膜上皮細胞からゲノム DNA を抽出し PCR を行った報告がなされている。今後さらなる研究の進展によりこれら前処理を行うマイクロ流体デバイスと本法を組み合わせ一枚のマイクロチップに集積することにより、毛髪や頬、あるいは生検サンプル由来の少量の細胞を添付すれば遺伝子多型解析結果が得られる POCT デバイスの実現につながるものと期待される。

マイクロチップを用いた血中バイオマーカー測定法の確立(第 3 章)

血液中には各種疾患、病態の状態を示すタンパク質が含まれており、それらは血中バイオマーカーと称され、その測定は診断、治療効果の判定のために重要である。これらの測定に多用されるサンドイッチ ELISA 法は、高い特異性と感度を持ち合わせているものの、測定に時間およそ数時間の時間を要し、合計で ml 単位のサンプルや試薬が必要となるのが現状である。そこで本研究では、マイクロチャネル内にて抗原抗体反応を行うことで、迅速、省サンプル、省試薬な血中バイオマーカー測定法の確立を目指した。本研究では、マイクロチャネルの特定部位に極少量の一次抗体を吐出・固定化できるインクジェット技術を利用した。この結果、骨形成マーカーである PICP を測定対象としたとき、96 穴プレートを用いた従来のサンドイッチ ELISA 法と比較して、抗原抗体反応時間は 1/6、血清サンプル量および二次抗体量は 1/50 と迅速、省サンプル、省試薬に解析可能なマイクロチップ法の確立に成功した。従来法とマイクロチップ法による血中 PICP 測定値を比較したとき、その相関係数 R^2 は 0.9914 と非常に高い相関を示し、マイクロチップ法により従来法と遜色ない測定が可能であることが示された。また、日差・日内変動についても 10% 以内と良好な再現性を得られている。

今回確立したマイクロチップ法は、迅速、省サンプル、省試薬であることはもちろん、抗体の組み合わせを変更することで他の血中バイオマーカーに適応可能であること、マイクロチャネルの特定部位に一次抗体を固定化することから 1 つのマイクロチャネルにて複数の血中バイオマーカーを同時測定することが可能であるといった利点があり、血中バイオマーカー測定の POCT 実現に向けての大きな 1 歩であると考えられる。しかしながら、実際に臨床の現場でこれらバイオマーカーを測定するに当たっては、採取した全血を添付するのみで測定を可能にする必要がある。よって、全血から血清を分離するようなマイクロ流体デバイス[12, 13]と今回のマイクロチップ法の集積がかなうことで、1 滴の全血を添付するのみで複数のバイオマーカーの測定結果が得られる POCT デバイスの実現が可能になると思われる。

以上から本研究によって、マイクロチップを用いた DNA とタンパク質という 2 種類の生体高分子の分離分析法を新規に確立することができた。今後のさらなる研究の進展により、遺伝子多型および血中バイオマーカー測定について医療の分野における μ -TAS、つまり POCT が実現することを期待する。

第4章 参考文献

- [1] M. Kataoka, Y. Fukura, Y. Shinohara, Y. Baba, *Electrophoresis*, **26**, 3025-3031 (2005)
- [2] M. Kataoka, S. Inoue, K. Kajimoto, Y. Shinohara, Y. Baba, *Eur. J. Biochem.*, **271**, 2241–2247(2004)
- [3] E. Maeda, M. Kataoka, M. Hino, K. Kajimoto, N. Kaji, M. Tokeshi, J. Kido, Y. Shinohara, Y. Baba, *Electrophoresis*, **28**, 2927-2933 (2007)
- [4] E. Maeda, M. Kataoka, S. Yatsushiro, K. Kajimoto, M. Hino, N. Kaji, M. Tokeshi, M. Bando, J. Kido, M. Ishikawa, Y. Shinohara, Y. Baba, *Electrophoresis*, **29**, 1902-1909 (2008)
- [5] Y. Umemoto, M. Kataoka, S. Yatsushiro, M. Watanabe, J. Kido, R. Kakuhata, T. Yamamoto, Y. Shinohara, Y. Baba, *Anal. Biochem.*, **388**, 161-163 (2009)
- [6] Y. Umemoto, M. Kataoka, S. Yatsushiro, S. Yamamura, T. Ooie, J. Kido, T. Yamamoto, Y. Shinohara, Y. Baba, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **52**, 323-328 (2010)
- [7] Y. Yamaguchi, S. Yatsushiro, S. Yamamura, H. Abe, K. Abe, M. Watanabe, K. Kajimoto, Y. Shinohara, Y. Baba, M. Kataoka, *Analyst*, **136**, 2247-2251(2011)
- [8] A.S. Aynacioglu, J. Brockmoller, S. Bauer, C. Sachse, P. Guzelbey P, *et al.*, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **48**, 409–415 (1999)
- [9] K. Itoh, K. Inoue, S. Yanagiwara, H. Kyoya, T. Suzuki, *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 77–79 (1999)
- [10] S. Svirid, S. Shpizen, E. Leitersdorf, M. Levy, Y. Caraco, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **65**, 275–282 (1999)
- [11] W. Cho, J.H. Maeng, Y. Ahn, S.Y. Hwang, *Electrophoresis*, **34**, 2531-2537 (2013)
- [12] S. Yang, A. Undar, J.D. Zahn, *Lab Chip*, **6**, 871-880 (2006)
- [13] T. Tachi, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba, *Anal. Chem.*, **81**, 3194-3198 (2009)

謝辞

本研究を行なうにあたり、終始、ご指導、ご鞭撻を賜りました、徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター 篠原 康雄 教授に心より感謝の意を表します。

また、本研究を遂行するに際して、深いご理解とご協力をいただき、常にご指導、ご討論していただきました、独立行政法人 産業技術総合研究所 健康工学研究部門 片岡 正俊 バイオマーカー解析グループ長に深謝いたします。

また、本研究を行うにあたり、常にご指導、ご討論していただきました、独立行政法人 産業技術総合研究所 健康工学研究部門 大家 利彦 副研究部門長、八代 聖基 主任研究員、山村 昌平 主任研究員、田中 正人 主任研究員に深く感謝いたします。

また、本稿をまとめるにあたりご査読、ご討論していただきました、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 田中 秀治 教授、伊藤 孝司 教授、徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター 山本 武範 講師に深く感謝いたします。

また、研究を通じてお世話になりました、名古屋大学工学部 馬場 嘉信 教授、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 木戸 淳一 准教授、北海道大学薬学部 梶本 和昭 准教授、松山大学薬学部 日野 真美 助教、独立行政法人 産業技術総合研究所 健康工学研究部門 安部 博子 主任研究員、阿部 佳織 産総研特別研究員に深く感謝いたします。

また、研究に際し、終始暖かく見守り続け、ご協力いただいた徳島大学薬学部生物薬品化学教室、ならびに徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター 蛋白質発現分野の皆様に感謝いたします。

最後にこれまで深い愛情と理解を持って応援し続けてくれた家族に感謝します。

2014 年 3 月
左少理恵